

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 Валентина Гейдебрехт, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

В. К. Божено, 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. Кжышковска, 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)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

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

Журнал включён в Scopus с 2017 года

Scopus®

Журнал включён в WoS с 2018 года

WEB OF SCIENCE™

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

**Google
scholar**

Журнал включён в РИНЦ, IF 2014: 0,139

**НАУЧНАЯ
ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU**

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Здесь находится открытый архив журнала

CYBERLENINKA

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 27.04.2018
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

EDITORS Valentina Geidebrekht, Liliya Egorova

PROOF-READER Olga Komar

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

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)

SUBMISSION <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus since 2017

Scopus®

Indexed in RSCI. IF 2016: 0,174

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Indexed in WoS since 2018

WEB OF SCIENCE™

Listed in HAC 27.01.2016 (no. 1760)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Five-year h-index is 3

Google
scholar

Open access to archive

CYBERLENINKA

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 27.04.2018
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР

5

Альтернативы антибиотикам: литические ферменты бактериофагов и фаговая терапия

П. А. Назаров

Alternatives to antibiotics: phage lytic enzymes and phage therapy

Nazarov PA

МНЕНИЕ

16

Производные трифенилфосфония как альтернатива обычным антибиотикам

Т. К. А. Пинто, А. Банерджи, П. А. Назаров

Triphenyl phosphonium-based substances are alternatives to common antibiotics

Pinto TCA, Banerjee A, Nazarov PA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

22

Физико-химические свойства и противомикробная активность рекомбинантного фаголизина бактериофага KPP10, действующего на *Pseudomonas aeruginosa*

Н. П. Антонова, В. Ю. Балабаньян, А. П. Ткачук, В. В. Макаров, В. А. Гуцин

Physical and chemical properties of recombinant KPP10 phage lysins and their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*

Antonova NP, Balabanyan VYu, Tkachuk AP, Makarov VV, Gushchin VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

30

Применение антимикробной фотодинамической терапии на основе МЦ540 к модели раневой инфекции

Т. А. Шмиголь, К. А. Собянин, М. В. Прусак-Глотов, С. П. Щелькалина, Е. В. Невежин, С. А. Ермолаева, В. В. Негребетский

The use of antimicrobial photodynamic therapy mediated by MC540 in the infected wound model

Shmigol TA, Sobianin KA, Prusak-Glotov MV, Shchelykalina SP, Nevezhin EV, Yermolaeva SA, Negrebetsky VadV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

36

Оценка рациональности проведения периоперационной антимикробной профилактики инфекционных осложнений у пациентов после хирургических вмешательств

Т. Е. Морозова, М. В. Лукина, Т. Б. Андрущишина, М. А. Чукина

Assessment of perioperative prophylaxis of infectious complications in post-op patients

Morozova TE, Lukina MV, Andrushishina TB, Chukina MA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

44

Анализ ассоциации полиморфных вариантов T>C rs767455 гена *TNFRSF1A* и T>G rs1061622 гена *TNFRSF1B* с развитием неалкогольного стеатогепатита

Л. В. Топчиева, И. В. Курбатова, О. П. Дуданова, А. А. Шиповская

Analysis of the association between the rs767455 T>C *TNFRSF1A* and rs1061622 T>G *TNFRSF1B* polymorphisms and nonalcoholic steatohepatitis

Topchieva LV, Kurbatova IV, Dudanova OP, Shipovskaya AA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

51

Распространенность вульгарного ихтиоза и частота мутаций R501X и 2282del4 в гене *FLG* в Ростовской области

С. С. Амелина, Е. В. Дегтерева, Н. В. Петрова, А. В. Марахонов, В. Е. Темников, Н. Е. Петрина, М. А. Амелина, Н. В. Ветрова, Т. И. Пономарева, Р. А. Зинченко

Prevalence of ichthyosis vulgaris and frequency of *FLG* R501X and 2282del4 mutations in the population of the Rostov region

Amelina SS, Degtereva EV, Petrova NV, Marakhonov AV, Temnikov VE, Petrina NE, Amelina MA, Vetrova NV, Ponomareva TI, Zinchenko RA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

56

Клинико-иммунологические характеристики нуммулярной экземы

В. Ю. Уджуху, Н. М. Шарова, Н. Г. Короткий, Е. В. Давтян, С. В. Кукало

Clinical manifestations and immunology of nummular eczema

Udzhukhu VYu, Sharova NM, Korotky NG, Davtyan EV, Kukalo SV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

60

Особенности экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в тканях первичных и рецидивирующих эндометриодных образований яичников

Л. С. Булатова, А. А. Соломатина, Е. Н. Карева, Н. А. Коцюбинская

Expression of steroid hormone receptors in the tissue of endometriomas in first-time and relapsing patients

Bulatova LS, Solomatina AA, Kareva EN, Kotsyubinskaya NA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

65

Исследование клонального репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов у пациента с анкилозирующим спондилитом

Е. А. Комеч, Ю. Б. Лебедев, А. В. Кошенкова, Д. С. Сырко, Е. А. Мусаткина, С. А. Лукьянов, Д. М. Чудаков, И. В. Звягин

A study of the repertoire of activated T-cell clones obtained from a patient with ankylosing spondylitis

Komech EA, Lebedev YB, Koshenkova AV, Syrko DS, Musatkina EA, Lukyanov SA, Chudakov DM, Zvyagin IV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

74

Регистрация динамики соотношения НАД⁺/НАДН в тканях эмбрионов рыб *Danio rerio* с помощью генетически кодируемого биосенсора

Д. С. Билан, А. Г. Шохина, А. С. Панова, В. В. Белоусов

Observing the dynamics of the NAD⁺ to NADH ratio in *Danio rerio* embryo tissues using a genetically encoded biosensor

Bilan DS, Shokhina AG, Panova AS, Belousov VV

МНЕНИЕ

80

Новая биолюминесцентная система грибов: перспективы использования в медицинских исследованиях

З. М. Осипова, А. С. Щеглов, И. В. Ямпольский

A bioluminescent system of fungi: prospects for application in medical research

Osipova ZM, Shcheglov AS, Yampolsky IV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

84

Разработка мероприятий по реабилитации пациентов с повреждением нижнего альвеолярного нерва

И. С. Копецкий, Д. А. Еремин, Н. В. Полунина, В. С. Полунин, Г. Н. Буслаева, А. К. Хетагурова

Rehabilitation of patients with inferior alveolar nerve injuries

Kopetsky IS, Eremin DA, Polunina NV, Polunin VS, Buslaeva GN, Khetagurova AK

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

90

Восстановление недавно полученных повреждений акромиально-ключичного сочленения методом динамической двухпучковой реконструкции

К. А. Егiazарян, Г. Д. Лазишвили, А. П. Ратьев, Э. Р. Шукюр-Заде

Repair of fresh injuries to the acromioclavicular joint by double-bundle reconstruction

Egiazaryan KA, Lazishvili GD, Ratiev AP, Shukyr-Zade ER

АЛЬТЕРНАТИВЫ АНТИБИОТИКАМ: ЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИОФАГОВ И ФАГОВАЯ ТЕРАПИЯ

П. А. Назаров ✉

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

Множественная лекарственная устойчивость госпитальных штаммов бактерий, возникшая в результате неразумного неконтролируемого применения антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве, представляет одну из серьезнейших угроз для современного здравоохранения: привычные инфекции вновь могут убивать, как раньше. Решение проблемы может быть найдено в процессе разработки альтернатив антибиотикам. В обзоре приведены краткие сведения о наиболее интересных подходах к созданию новых антибактериальных средств и подробно проанализированы наиболее перспективные из них, такие как фаговая терапия и литические ферменты бактериофагов (фаголизины).

Ключевые слова: антибиотик, бактериофаг, фаголизин, фаговая терапия, антибиотикотерапия, множественная лекарственная устойчивость

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-50-00029).

Благодарности: автор благодарит сотрудников лаборатории биофизики мембран, отдела биоэнергетики НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ, лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и лаборатории генетики бактериофагов НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова за обсуждения некоторых аспектов использования бактериофагов, фаголизин и антибактериальной фотодинамической терапии.

✉ **Для корреспонденции:** Назаров Павел Александрович
ул. Наримановская, д. 22, к. 3, кв 294, г. Москва, 117997; nazarovpa@gmail.com

Статья получена: 23.01.2018 **Статья принята к печати:** 28.01.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.002

ALTERNATIVES TO ANTIBIOTICS: PHAGE LYTIC ENZYMES AND PHAGE THERAPY

Nazarov PA ✉

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Multiple drug resistance of nosocomial bacterial strains provoked by the unwise and uncontrolled use of antibiotics in medicine and agriculture seriously threatens modern healthcare: minor and trivial infections are about to kill again. A solution may lie in the development of new alternatives to antibiotics. This review highlights the most interesting approaches to the development of antibacterial drugs focusing on the most promising ones, such as phage therapy and phage lytic enzymes (lysins).

Keywords: antibiotic, bacteriophage, phage lysin, phage therapy, antibiotic treatment, multiple drug resistance

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant ID 14-50-00029).

Acknowledgement: the author wishes to thank the researchers from the Laboratory of Membrane Biophysics (Department of Bioenergetics, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology), the Laboratory of Molecular Bioengineering (Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry) and the Laboratory of Bacteriophage Genetics (Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera) for discussing with him some aspects of the use of bacteriophages, phage lysins and antibacterial photodynamic therapy.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel Nazarov
ul. Narimanovskaya 22, k.3, kv. 294, Moscow, 117997; nazarovpa@gmail.com

Received: 23.01.2018 **Accepted:** 28.01.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.002

Эпоха антибиотиков: от побед к поражениям

Еще в начале 19 в. общераспространенной была точка зрения, что основной причиной заболеваний является нарушение равновесия в организме, и только в середине 19 в. Луи Пастер показал, что инфекционные заболевания возникают в результате негативного воздействия микроорганизмов. В 1928 г. произошло эпохальное для медицины событие: британским бактериологом Александром Флемингом был обнаружен первый антибиотик пенициллин. Это положило начало эпохе антибиотиков, которые поначалу представлялись «лекарством от всех бед», супероружием, способным переломить ход борьбы человечества с инфекциями. Однако эйфория была недолгой. Углубление

знаний о бактериях привело к появлению большого числа антибиотиков, разнообразных по механизму и широте спектра действия и химическим свойствам, но бактерии ответили на это развитием антибиотикорезистентности, сводящей на нет все усилия ученых и врачей [1]. Надежды возлагались на антибиотики последнего резерва, такие как колистин и даптомицин.

В мае 2015 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала резистентность к антибиотикам причиной кризиса современной медицины и предложила Глобальный план борьбы с устойчивостью к противомикробным препаратам [2]. Однако уже в ноябре 2015 г. появилось сообщение об обнаружении гена трансмиссивной устойчивости к колистину [3], а в октябре 2016 г. — об обнаружении

золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*), устойчивого к даптомицину за счет снижения активности антибиотика посредством выделения во внешнюю среду мембранных фосфолипидов, в мицеллы которых встраивается даптомицин [4]. Чуть раньше, в сентябре 2016 г., одна американская пациентка умерла от сепсиса, вызванного грамотрицательной «супербактерией» *Klebsiella pneumoniae*, устойчивой ко всем 26 антибиотикам, разрешенным в США [5]. В докладе [6], опубликованном через год, ВОЗ, проанализировав известные антибиотики и их комбинации, используемые в клинической практике, пришла к выводу, что отсутствует потенциальная возможность лечения инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями, обладающими множественной лекарственной устойчивостью. Таким образом, казавшийся надежным барьер — антибиотики последнего резерва — пал, и привычные инфекции снова могут убивать как раньше. Очевидно, что остро встают проблемы получения принципиально новых антибиотиков или разработки альтернатив антибиотикам, способных сравниться с ними по эффективности.

Получение новых антибиотиков

Антибиотики — вещества природного, полусинтетического или синтетического происхождения, в малых концентрациях подавляющие жизненные процессы микроорганизмов. Получение антибиотиков осуществляется либо поиском антибиотиков среди актиномицетов (реже — среди нематодных бактерий), либо перебором химических структур с последующим моделированием расположения (молекулярным докингом) перспективной структуры в активном центре предполагаемой мишени.

В настоящий момент получение новых антибиотиков практически приостановлено по нескольким причинам. Во-первых, мишень большинства антибиотиков — это один из трех ключевых прокариотических метаболических путей или процессов, а именно: 1) биосинтез белка, 2) репликация ДНК, 3) биосинтез клеточной стенки бактерий [7]. Большинство принципиально новых подходов к данным мишеням были найдены ранее. Кроме того, спонтанные мутации бактерий могут за несколько дней уничтожить труд нескольких лет работы научно-исследовательской лаборатории, что делает подобный подход очень рискованным и дорогостоящим. Во-вторых, примерно один миллион новых актиномицетов необходимо проанализировать, чтобы найти всего лишь один новый антибиотик [8], и это сильно удорожает исследования.

Более 90 % всех видов бактерий, обнаруженных во внешней среде, являются некультивируемыми в обычных лабораторных условиях [9], но в настоящее время стало возможным создание специальных условий для их культивирования и поиска среди них продуцентов новых антибиотиков. В связи с этим возникли две принципиально различные стратегии поиска новых антибиотиков: поиск антибиотиков среди «некультивируемых» бактерий и создание принципиально новых искусственных молекул антибиотиков. Обе стратегии уже дают результаты. Так, при скрининге некультивируемых почвенных бактерий был обнаружен новый антибиотик тейкобактин, действующий на грамположительные микроорганизмы [10]. Также был синтезирован новый антибиотик PEG-2S, являющийся ингибитором переносающей Na^+ НАДН-убихинон-оксидоредуктазы [11].

Особенно перспективно применение синтетических антибиотиков, нацеленных на бактериальную биоэнергетику

[12]. Так, в 2012 г. впервые за четыре десятилетия поисков был получен и разрешен к применению Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) антибиотик бедаквилин для лечения туберкулеза, особенностью которого является нацеленность на АТФ-синтазу микобактерий: клетки с угнетенной биоэнергетикой погибают [13].

Также на основе симбиотической теории было выдвинуто предположение, что митохондриально направленные антиоксиданты, снижающие потенциал мембраны митохондрий, могут являться эффективными антибиотиками, и это предположение нашло подтверждение на практике: было обнаружено новое свойство митохондриально направленного антиоксиданта SkQ1, синтетического производного трифенилфосфония, убивать бактерии за счет снижения их мембранного потенциала [14, 15].

Альтернативы антибиотикам

Несмотря на довольно большое разнообразие подходов к получению эффективных альтернатив антибиотикам и их изучение на протяжении более чем десяти лет, ярких прорывов в лечении инфекций с их помощью не произошло. Лишь некоторые альтернативы антибиотикам являются таковыми, что связывают прежде всего с по-прежнему более высокой эффективностью антибиотикотерапии.

Наиболее интересными альтернативами являются: вакцины, антитела, пробиотики, иммуностимуляторы, фотосенсибилизаторы, бактериофаги, фаголизины, искусственные бактериофаги, антимикробные пептиды, пептиды, защищающие хозяина, антибиопленочные соединения, ингибиторы помп множественной лекарственной устойчивости, иммуносупрессанты, липосомные ловушки для токсинов, хелаторы металлов, антибактериальные нуклеиновые кислоты, противорезистентные нуклеиновые кислоты, противобактериальные пептиды. Этот список не является исчерпывающим.

Основываясь на оценке клинического потенциала и относительной простоты применения, можно сказать, что наибольшим потенциалом в качестве альтернативы антибиотикам обладают фаголизины и ингибиторы помп множественной лекарственной устойчивости — как терапевтические агенты, вакцины и антитела — для профилактики и пробиотики — для лечения и профилактики. Большим потенциалом обладают также бактериофаги и антибиопленочные соединения, антимикробные пептиды и фотосенсибилизаторы, однако их появление на рынке готовых препаратов для замены антибиотиков пока остается под вопросом. Значение иммуностимуляторов, уже используемых для профилактики заболеваний и в качестве дополнительных средств при терапии, для клинической практики неясно, поэтому они не выглядят полноценной заменой антибиотикам.

Многие из вышеперечисленных подходов находятся на этапе экспериментальных исследований или даже разработаны только теоретически. Подробную информацию о большинстве из них можно найти в обзоре [16], написанном исследователями из академических и промышленных кругов по заказу фонда Wellcome Trust (Великобритания). В данном обзоре рассматриваются наиболее перспективные и интересные альтернативы антибиотикам, такие как вакцины, антитела, ингибиторы помп множественной лекарственной устойчивости, фотосенсибилизаторы, бактериофаги и фаголизины.

Вакцины

Вакцины являются одним из наиболее разработанных подходов с большим профилактическим потенциалом. В 2015 г. в Великобритании начала применяться мульткомпонентная вакцина Bexsero (GlaxoSmithKline Biologicals, Великобритания) против бактерии *Neisseria meningitidis*, возбудителя детского менингита и бактериемии. Из-за того, что капсулярный полисахарид MenB, определяющий вирулентность бактерии, похож на молекулы клеточной адгезии человека, получение эффективных антител к менингококкам является непростой задачей. Она была решена за счет биоинформатического поиска потенциального антигена, который затем в составе частиц наружной менингококковой мембраны оказался способен давать иммунный ответ при вакцинации. Данный подход называется обратной вакцинологией (reverse vaccinology), и полученная британцами вакцина эффективна против 73–88 % штаммов менингококков группы B (MenB) [17]. Однако замена антибиотиков подобными вакцинами в настоящее время маловероятна.

Антитела

Наряду с антибиотиками краеугольным камнем современной медицины являются антитела, которые обладают широким спектром уникальных свойств. Существуют две концепции их применения: 1) патоген-специфичные моноклональные антитела используются самостоятельно для предотвращения развития инфекции или 2) в комбинации с антибиотиками для лечения бактериальных инфекций [18]. Антитела используются как анатоксины для нейтрализации эффектов бактериальных токсинов [19–22], а также могут быть направлены на бактериальные антигены [23–25] и сигналы чувства кворума [26, 27]. Использование антител в комбинации со стандартными антибиотиками открывает возможности для подавления развития биопленок, что повышает эффективность антибиотикотерапии, и для борьбы с популяцией клеток-персисторов, не чувствительных к антибиотикам [28, 29].

Ингибиторы помп множественной лекарственной устойчивости

Этот подход использовался ранее, но в настоящее время ему уделяется пристальное внимание [30, 31] в связи с особенностями взаимодействия субстратов помп множественной лекарственной устойчивости и их ингибиторов [15, 32]. Этот подход является принципиально новым и не описан в обзоре [16]. Он позволяет снизить терапевтическую концентрацию антибиотиков на 1–2 порядка. Впервые это было показано на антибиотике SkQ1, где удаление помпы приводило к снижению минимальной ингибирующей концентрации примерно в 50 раз. К сожалению, все осложняется тем, что обычно в выкачке антибиотиков участвует не одна помпа, а ингибиторы часто действуют на множество помп одновременно. Тем ценнее тот факт, что антибиотик SkQ1 является уникальным для основной помпы множественной лекарственной устойчивости *Escherichia coli* — AcrAB-TolC [15]. Несомненно, применение ингибиторов помп множественной лекарственной устойчивости во многом снимает проблему резистентности бактерий к антибиотикам.

Фотосенсибилизаторы

Антимикробная фотодинамическая терапия и антимикробная фотодинамическая инактивация (aPDT и aPDI) являются новыми эффективными способами уничтожения грамотрицательных и грамположительных бактерий и дрожжей [33–36]. aPDI является нетермической реакцией, вызываемой взаимодействием квантов видимого света с фотосенсибилизаторами (метиленовый синий, хлорины, порфирины, хлорофиллы и их производные) в присутствии кислорода. Активные формы кислорода, возникающие при этом по механизму I или II (рис. 1), эффективно уничтожают бактериальные клетки, включая клетки *Pseudomonas aeruginosa*. Данная терапия особенно эффективна в стоматологии и дерматологии [36], где способна заменить антибиотики «местного действия».

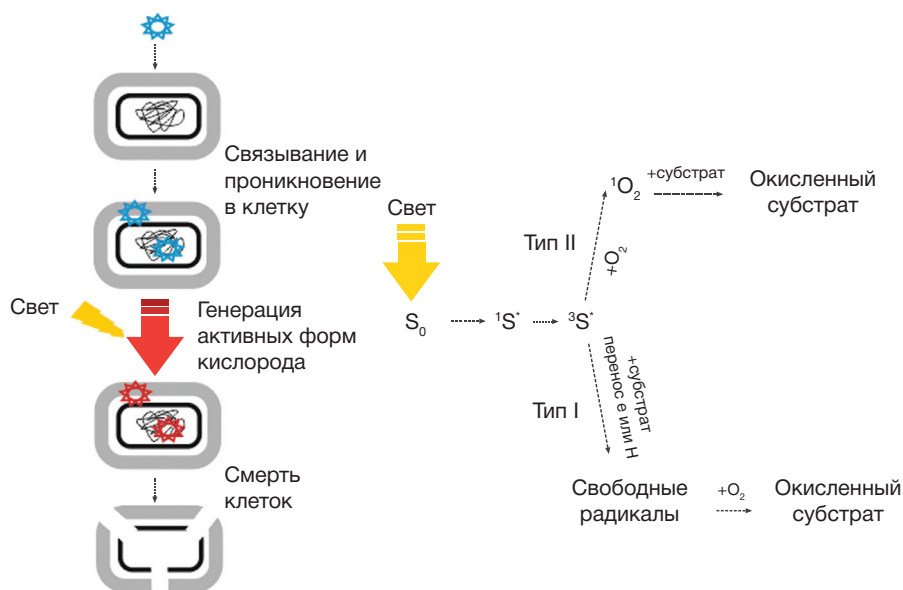


Рис. 1. Схема антибактериальной фотодинамической терапии (слева). Реализация фотодинамических эффектов на молекулярном уровне (справа). При поглощении кванта света молекула фотосенсибилизатора (S₀) переходит на короткоживущий синглетный уровень (¹S*), а затем переходит в триплетное состояние (³S*). После этого реализуется один из двух сценариев: либо ³S* вступает в реакции с молекулами субстрата с образованием промежуточных радикалов, которые в присутствии кислорода повреждают биологические структуры и макромолекулы в клетке (тип I), либо энергия с ³S* переносится на кислород с образованием активного синглетного кислорода (¹O₂), который также повреждает биологические структуры и макромолекулы в клетке (тип II)

Фаговая терапия

Вирусы бактерий (бактериофаги) — крупнейшая из известных групп вирусов, содержащих преимущественно двухцепочечную геномную ДНК, хотя встречаются небольшие группы фагов с одноцепочечной ДНК, а также с двух- и одноцепочечной РНК [37]. В мире насчитывается примерно 10^{31} – 10^{32} фагов [38], и они играют важную роль в регуляции мировой популяции бактерий. Так, бактериофаги ответственны за гибель 20–40 % морских бактерий ежедневно [39]. Использование фагов в качестве лечебных препаратов было предложено и успешно испытано Твортом [40], Д'Эрелем [41] и Брийоном и Майсином [42] в начале 20 в. Использование фагов в качестве лечебных препаратов не нашло своего распространения в связи с успехами антибиотикотерапии и нехваткой теоретических данных, которая не позволяла объяснить неудачи клинических испытаний [43].

В соответствии с современными представлениями для лечения бактериальной инфекции фаговыми препаратами должно соблюдаться несколько условий: 1) используемый бактериофаг должен быть литическим; 2) необходимо подбирать титр бактериофага под конкретную инфекцию; 3) фаговый рецептор должен быть известен; 4) препарат фага должен быть свободен от бактерий и 5) должен содержать живые частицы бактериофага [44–46]. При этом эффективность фаговой терапии, т. е. снижение количества патогенных бактерий до уровня, с которым уже может справиться защитная система организма [47], зачастую является индивидуальным параметром наряду с другими факторами, что препятствует выходу фаговых препаратов на рынки Европы и США [46].

Бактериофаги, так же как и антибиотики, напрямую уничтожают бактерии, поэтому можно сравнивать их эффективность. Без сомнения, бактериофаги более специфичны к конкретным штаммам бактерий, что может быть положительной стороной их использования, например в случае с антибиотик-ассоциированной диареей и инфекцией, вызванной *Clostridium difficile* [48]. При этом фаговая терапия наносит значительно меньший ущерб организму, чем антибиотикотерапия [49, 50]. Однако в условиях, когда инфекция вызвана рядом разных бактерий, как это происходит при раневых инфекциях, бактериофаги значительно уступают антибиотикам в эффективности [51].

Перекрестное заражение бактерий *E. coli* бактериофагами, полученными в Мексике и Бангладеш, географически удаленных регионах, показало высокую специфичность фагов к бактериям из своего региона [52]. Попытки же применить коктейль бактериофагов, производимый в России, в отношении когорты из 160 детей из Бангладеш, страдавших от диареи, вызванной кишечной палочкой, не выявил отличий в сравнении с плацебо [53]. При этом бактериофаги, поражающие антибиотикорезистентные бактерии, легче всего обнаруживаются в местах, где антибиотикорезистентные бактерии были получены [54]. Эти данные позволяют под другим углом посмотреть на проблему антибиотикорезистентности и применения фаговой терапии для лечения.

Применение бактериофагов для лечения инфекций, обычно вызываемых бактериями, образующими биопленки, представляется довольно интересным. В этом случае антибиотики недостаточно эффективны: только высокие и токсичные дозы антибиотиков способны останавливать рост биопленок [55]. Применение же бактериофагов *in vitro* не только препятствует формированию биопленок,

но приводит к полному уничтожению биопленок, образованных бактериями *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa* и *Staphylococcus epidermidis* [56, 57].

Для оценки возможных осложнений во время фаговой терапии необходимо знание как нюансов биологии, так и полного генома бактериофага, т. к. некоторые фаги могут содержать гены факторов вирулентности или токсинов [58], а также гены антибиотикорезистентности [59–62]. Существование фаг-ассоциированных токсинов ботулизма [59], дифтерии [58], холеры [63], а также возможная конверсия нетоксичной бактерии в токсичную под действием фага, кодирующего токсины [64], делает фаговую терапию более сложной, чем использование антибиотикотерапии. Считается, что жизненные циклы бактериофагов (рис. 2) могут варьировать от литических до лизогенных через различные вариации псевдолизогенных и критических (дефектных) жизненных циклов [65, 66], а анализ геномов гигантских бактериофагов *P. aeruginosa* [67–69] показал, что продукты ряда генов имеют большое сходство с не охарактеризованными по функции белками различных организмов.

Таким образом, сложные жизненные циклы, потенциальная опасность конверсии и переноса генов резистентности, изменчивость как самих бактериофагов, так и мутации в бактериальной популяции делают фаговую терапию довольно нестабильной, что подтверждается недостаточным распространением этой потенциально эффективной альтернативы антибиотикам.

Литические ферменты бактериофагов (фаголизины)

Клеточная стенка бактерий — барьер, который ДНК любого бактериофага обязана преодолеть, чтобы инфицировать бактерию и уже в виде готовой вирусной частицы выйти из нее. Клеточная стенка бактерий является сложноорганизованной и упорядоченной системой липидных и

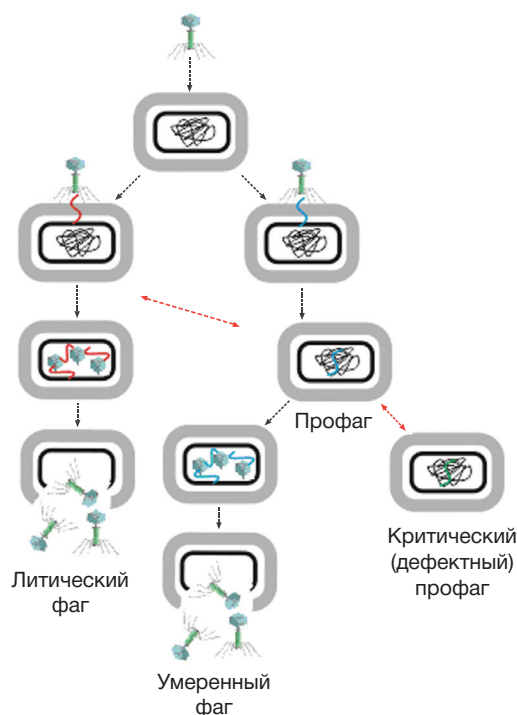


Рис. 2. Схема альтернатив развития фаговой инфекции в популяции бактерий. Красным цветом выделены возможные обратимые переходы, связанные с мутациями, обрывами генома на стадии профага, делециями, заменами и т. д.

пептидогликановых слоев, затрудняющих попадание чужеродных веществ внутрь бактериальной клетки. По своему составу она бывает трехслойной (грамотрицательный тип) и двухслойной (грамположительный тип). Трехслойная клеточная стенка состоит из внутренней (плазматической) мембраны, пептидогликанового слоя и наружной мембраны [70, 71], а двухслойная — лишена наружной мембраны.

Наиболее сложным для проникновения является пептидогликановый слой, который построен из чередующихся и соединенных посредством β -1,4-гликозидных связей остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты с присоединенным пептидным фрагментом. Сшитые между собой блоки пептидогликанов (муреин) образуют, по существу, единую гигантскую макромолекулу, которая определяет прочность пептидогликанового слоя и его непроницаемость для вирусных частиц и токсических факторов большой массы [37, 70, 71]. Таким образом, для проникновения фаговой ДНК внутрь клетки фагу необходимо

локально нарушить целостность как клеточных мембран, так и пептидогликанового слоя. Задачу разрушения пептидогликанового слоя берут на себя литические ферменты, которые в литературе получили название лизинов бактериофагов (фаголизины, эндолизины или виролизины).

Необходимо отметить, что в процессе инфицирования бактерии происходят 2 акта лизиса пептидогликанового слоя [72]: «лизис извне» и проникновение ДНК фага и «лизис изнутри» и выход новых фаговых частиц. Обычно «лизис извне» осуществляется ассоциированным с капсидом фаголизином, например у бактериофага Т4 это структурный белок базальной пластинки gp5, который содержит функциональный домен, обладающий свойствами фаголизина [73, 74]. При этом «лизис извне» является точечным и ограничен в пространстве и времени, чтобы фаговая ДНК могла проникнуть в клетку, но при этом фаг не убил ее. «Лизис изнутри» обычно осуществляется растворимым фаголизином и, в противоположность «лизису извне», не

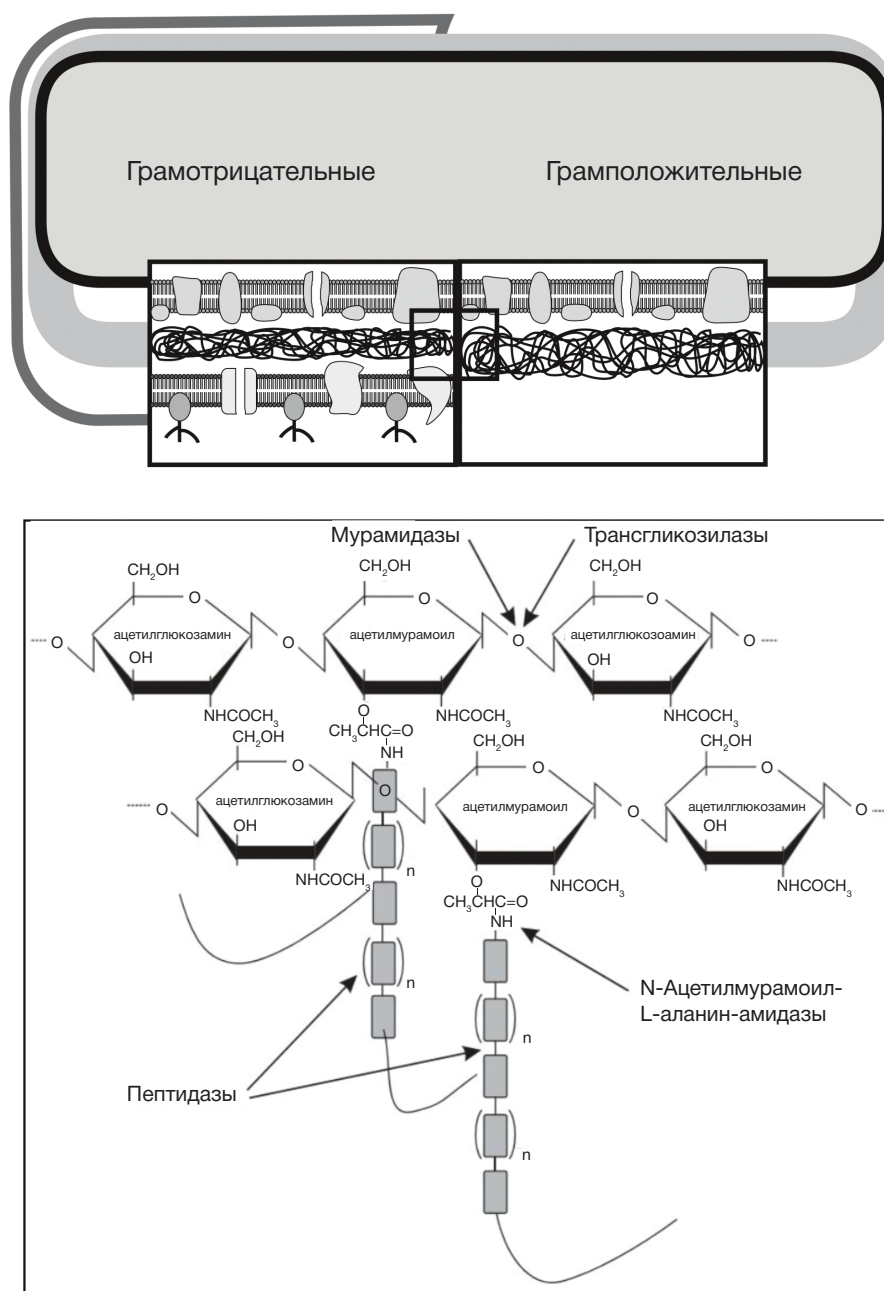


Рис. 3. Схема устройства бактериальной клеточной стенки и классы фаголизин, участвующих в деградации пептидогликанового слоя

ограничен в пространстве, но четко привязан ко времени. Он осуществляется после масштабного синтеза фаголизина в клетке и запускается одновременно с синтезом и встраиванием в мембрану специального регуляторного белка «холина» (от hole — дыра), образующего неселективные поры в бактериальной мембране. Эти поры нарушают метаболизм бактерии и одновременно открывают фаголизинам доступ к пептидогликановому слою, тем самым вызывая его тотальный лизис с последующим разрушением клетки и выходом фаговых частиц наружу [75–77].

Очевидно, что с точки зрения замены антибиотиков растворимые фаголизины, осуществляющие масштабный «лизис изнутри», представляют особый интерес, т. к. способны эффективно лизировать пептидогликан и, в отличие от фага, не требуют регуляторного белка «холина».

Существует несколько классификаций фаголизинов [78–85], наиболее интересной из которых является классификация по механизму действия: 1) лизоцимподобные мурамидазы (гидролизуют β 1–4-связь между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамином в молекуле пептидогликана; подразделяются на мурамидазы и литические трансгликозилазы); 2) N-ацетилмурамил-L-аланин-амидазы (гидролизуют амидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином); 3) пептидазы (гидролизуют пептидную связь между аминокислотами пептидогликана) и 4) эстеразы (рис. 3).

При изучении автолитических ферментов пневмококков *S. pneumoniae* было обнаружено, что фаголизины имеют модульное строение, где один домен узнает место лизиса, а другой — производит расщепление пептидогликана [86]. Модульное строение оказалось свойственно как новым, так и ранее открытым фаголизинам [87–89], а генно-инженерные эксперименты по комбинированию и перестановке функциональных доменов стали подтверждением этого факта [90].

Конечно, не все фаголизины имеют одинаковый терапевтический потенциал, однако ряд свойств, например свойство фаголизина PlySs2 после 10 последовательных этапов заморозки и оттаивания сохранять свою функциональность [91] и свойство фаголизина PlyG атаковать эндоспоры бацилл *Bacillus anthracis* [92], делает фаголизины

интересным и перспективным объектом исследований. Еще одним интересным свойством фаголизинов является их видоспецифичность, т. е. они способны убивать только те виды или подвиды бактерий, против которых направлены их фаги [93, 94].

Простота генно-инженерных манипуляций и модульное строение позволили создать комбинации гибридных фаголизинов для лечения сложных бактериальных инфекций, вызываемых метицилин-резистентным штаммом *S. aureus* (MRSA) [95], а комбинации с низкомолекулярными антибиотиками, например фаголизина Cpl-1 и пенициллина или гентамицина, могут приводить к полному уничтожению пневмококков пенициллин-устойчивого штамма [96].

Однако отсутствие фаговой «машинерии», позволяющей проникать сквозь сложную бактериальную стенку, ограничивает применение фаголизинов. У грамотрицательных бактерий внешняя мембрана снижает эффективность терапии почти до нуля [94], тогда как в отношении грамположительных бактерий она остается высокой. Также остается опасность выработки антител к фаголизинам, препятствующих их работе. Было показано, что *in vitro* и *in vivo* антитела замедляют, но не полностью блокируют лизис бактериальных клеток [97], что может объясняться тем, что аффинность фаголизинов к своим субстратам может быть выше, чем аффинность антитела к ферменту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое число потенциально перспективных альтернатив, ни одну из них нельзя назвать полноценной заменой антибиотикам. Все они уступают в чем-либо: безопасности, предсказуемости лечения, масштабируемости, управляемости, простоте и эффективности лечения. При этом очевидно, что развитие альтернативных подходов к антибактериальной терапии — насущная потребность современного здравоохранения. По всей видимости, наиболее перспективными окажутся смешанные подходы антибиотикотерапии и альтернатив антибиотикам, где за счет синергии будет достигаться эффект, превосходящий таковой от антибиотикотерапии и альтернативного метода лечения по отдельности.

Литература

1. Назаров П. А. Человечество может выиграть войну против бактерий. Коммерсант Наука. 2017; (5): 20–2.
2. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2015. 21 p. Available from: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb; 16 (2): 161–8. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
4. Pader V, Hakim S, Painter KL, Wigneshweraraj S, Clarke TB, Edwards AM. Staphylococcus aureus inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids. Nat Microbiol. 2016 Oct 24; 2: 16194. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.194.
5. Chen L, Todd R, Kiehlbauch J, Walters M, Kallen A. Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae — Washoe County, Nevada, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2017 Jan 13; 66 (1): 33. DOI: 10.15585/mmwr.mm6601a7.
6. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2017. 48 p. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=1>.
7. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat Rev Microbiol. 2010 Jun; 8 (6): 423–35. DOI: 10.1038/nrmicro2333.
8. Baltz RH. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. Microbe. 2007; 2 (3): 125–31.
9. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov. 2013 May; 12 (5): 371–87. DOI: 10.1038/nrd3975.
10. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature. 2015 Jan 22; 517 (7535): 455–9. DOI: 10.1038/nature14098.
11. Dibrov P, Dibrov E, Maddaford TG, Kenneth M, Nelson J, Resch C et al. Development of a novel rationally designed antibiotic to inhibit a nontraditional bacterial target. Can J Physiol Pharmacol. 2017 May; 95 (5): 595–603. DOI: 10.1193/cjpp-2016-0505.
12. Hards K, Cook GM. Targeting bacterial energetics to produce

- new antimicrobials. *Drug Resistance Updates*. 2018; 36: 1–12.
13. Jones D. Tuberculosis success. *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12 (3): 175–6.
 14. Khailova LS, Nazarov PA, Sumbatyan NV, Korshunova GA, Rokitskaya TI, Dedukhova VI et al. Uncoupling and Toxic Action of Alkyltriphenylphosphonium Cations on Mitochondria and the Bacterium *Bacillus subtilis* as a Function of Alkyl Chain Length. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Dec; 80 (12): 1589–97. DOI: 10.1134/S000629791512007X.
 15. Nazarov PA, Osterman IA, Tokarchuk AV, Karakozova MV, Korshunova GA, Lyamzaev KG et al. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci Rep*. 2017 may 3; 7 (1): 1394. DOI: 10.1038/s41598-017-00802-8.
 16. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb; 16 (2): 239–51. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00466-1.
 17. Ladhani SN, Campbell H, Parikh SR, Saliba V, Borrow R, Ramsay M. The introduction of the meningococcal B (MenB) vaccine (Bexsero®) into the national infant immunisation programme—New challenges for public health. *J Infect*. 2015 Dec; 71 (6): 611–4. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.09.035.
 18. DiGiandomenico A, Sellman BR. Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation? *Curr Opin Microbiol*. 2015 Oct; 27: 78–85. DOI: 10.1016/j.mib.2015.07.014.
 19. Babcock GJ, Broering TJ, Hernandez HJ, Mandell RB, Donahue K, Boatright N et al. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. *Infect Immun*. 2006 Nov; 74 (11): 6339–47. DOI: 10.1128/IAI.00982-06.
 20. Foletti D, Strop P, Shaughnessy L, Hasa-Moreno A, Casas MG, Russell M et al. Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin. *J Mol Biol*. 2013 May 27; 425 (10): 1641–54. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.008.
 21. Oganessian V, Peng L, Damschroder MM, Cheng L, Sadowska A, Tkaczyk C et al. Mechanisms of neutralization of a human anti-alpha toxin antibody. *J Biol Chem*. 2014 Oct 24; 289 (43): 29874–80. DOI: 10.1017/jbc.M114.601328.
 22. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN et al. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med*. 2010 Jan 21; 362 (3): 197–205. DOI: 10.1056/NEJMoa0907635.
 23. Szijártó V, Lukaszewicz J, Gozdiewicz TK, Magyarics Z, Nagy E, Nagy G. Diagnostic potential of monoclonal antibodies specific to the unique O-antigen of multidrug-resistant epidemic *Escherichia coli* clone ST131-O25b:H4. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Jul; 21 (7): 930–9. DOI: 10.1128/CI.00685-13.
 24. Kelly-Quintos C, Cavacini LA, Posner MR, Goldmann D, Pier GB. Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine. *Infect Immun*. 2006 May; 74 (5): 2742–50. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2742-2750.2006.
 25. Hazenbos WL, Kajihara KK, Vandlen R, Morisaki JH, Lehar SM, Kwakkenbos MJ et al. Novel staphylococcal glycosyltransferases SdgA and SdgB mediate immunogenicity and protection of virulence-associated cell wall proteins. *PLoS Pathog*. 2013; 9 (10): e1003653. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003653.
 26. Palliyil S, Downham C, Broadbent I, Charlton K, Porter AJ. High-sensitivity monoclonal antibodies specific for homoserine lactones protect mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Jan; 80 (2): 462–9. DOI: 10.1128/AEM.02912-13.
 27. Palliyil S. Generation of High-Sensitivity Monoclonal Antibodies Specific for Homoserine Lactones. *Methods Mol Biol*. 2018; 1673: 325–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-7309-5_25.
 28. Varshney AK, Wang X, MacIntyre J, Zollner RS, Kelleher K, Kovalenko OV et al. Humanized staphylococcal enterotoxin B (SEB)-specific monoclonal antibodies protect from SEB intoxication and *Staphylococcus aureus* infections alone or as adjunctive therapy with vancomycin. *J Infect Dis*. 2014 Sep 15; 210 (6): 973–81. DOI: 10.1093/infdis/jiu198.
 29. Hilliard JJ, Datta V, Tkaczyk C, Hamilton M, Sadowska A, Jones-Nelson O et al. Anti- alpha toxin monoclonal antibody and antibiotic combination therapy improves disease outcome and accelerates healing in a *Staphylococcus aureus* dermonecrosis model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jan; 59 (1): 299–309. DOI: 10.1128/AAC.03918-14.
 30. Zou L, Liu M, Wang Y, Lu J, Pang Y. Determination of in vitro synergy between linezolid and other antimicrobial agents against *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015 Dec; 95 (6): 839–42. DOI: 10.1016/j.tube.2015.07.003.
 31. Berditsch M, Jäger T, Stempel N, Schwartz T, Overhage J, Ulrich AS. Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin B and gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep; 59 (9): 5288–96. DOI: 10.1128/AAC.00682-15.
 32. Krishnamoorthy G, Leus IV, Weeks JW, Wolloscheck D, Rybenkov VV, Zgurskaya HI. Synergy between Active Efflux and Outer Membrane Diffusion Defines Rules of Antibiotic Permeation into Gram-Negative Bacteria. *MBio*. 2017; 8 (5): e01172-17. DOI: 10.1128/mBio.01172-17.
 33. Omarova EO, Nazarov PA, Firsov AM, Strakhovskaya MG, Arkhipova AY, Moisenovich MM et al. Carboranyl-Chlorin e6 as a Potent Antimicrobial Photosensitizer. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0141990. DOI: 10.1371/journal.pone.0141990.
 34. Maliszewska I, Kałas W, Wysokińska E, Tylus W, Pietrzyk N, Popko K et al. Enhancement of photo-bactericidal effect of tetrasulfonated hydroxylaluminum phthalocyanine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Med Sci*. 2018 Jan; 33 (1): 79–88. DOI: 10.1007/s10103-017-2337-0.
 35. Fekrazad R, Zare H, Vand SM. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Sep; 15: 213–7. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.001.
 36. Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Aug; 8 (2): 108–20.
 37. Мирошников К. А., Чертков О. В., Назаров П. А., Месянжинов В. В. Пептидо-гликанлизирующие ферменты бактериофагов — перспективные противобактериальные агенты. *Успехи биологической химии*. 2006; 46: 65–98.
 38. Suttle CA. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Oct; 5 (10): 801–12. DOI: 10.1038/nrmicro1750.
 39. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 2014 Jan 1; 5 (1): 226–35. DOI: 10.4161/viru.25991.
 40. Twort FW. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet*. 1915 Dec 4; (4814): 1241–3.
 41. D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci (Paris)*. 1917; 165: 373–5. French.
 42. Bruynoghe R., Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. *C R Soc Biol*. 1921; 85: 1120–1. French.
 43. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol*. 1997 Jul; 5 (7): 268–71. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01054-8.
 44. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar; 45 (3): 649–59. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
 45. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol*. 2006 Feb; 296 (1): 5–14. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.09.002.
 46. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017 Aug 6; 8 (3): 162–173. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
 47. Levin B, Bull JJ. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *Am Naturalist*. 1996; 147: 881–98.
 48. Rea K, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome: A key regulator of

- stress and neuroinflammation. *Neurobiol Stress*. 2016 Oct; 4: 23–33. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.03.001.
49. Mai V, Ukhanova M, Reinhard MK, Li M, Sulakvelidze A. Bacteriophage administration significantly reduces *Shigella* colonization and shedding by *Shigella*-challenged mice without deleterious side effects and distortions in the gut microbiota. *Bacteriophage*. 2015 Aug; 5 (4): e1088124. DOI: 10.10180/21597081.2015.1088124.
 50. Galtier M, De Sordi L, Maura D, Arachchi H, Volant S, Dillies MA et al. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environ Microbiol*. 2016 Jul; 18 (7): 2237–45. DOI: 10.1111/1462-2920.13284.
 51. Servick K. Drug development. Beleaguerd phage therapy trial presses on. *Science*. 2016 Jun 24; 352 (6293): 1506. DOI: 10.1126/science.352.6293.1506.
 52. Bourdin G, Navarro A, Sarker SA, Pittet AC, Qadri F, Sultana S et al. Coverage of diarrhoea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails. *Microb Biotechnol*. 2014 Mar; 7 (2): 165–76. DOI: 10.1111/1751-7915.12113.
 53. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea with Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children from Bangladesh. *EBioMedicine*. 2016 Jan 5; 4: 124–37. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.12.023.
 54. Latz S, Wahida A, Arif A, Häfner H, Hoß M, Ritter K et al. Preliminary survey of local bacteriophages with lytic activity against multi-drug resistant bacteria. *J Basic Microbiol*. 2016 Oct; 56 (10): 1117–23. DOI: 10.1002/jbm.201600108.
 55. Abedon ST. Ecology of Anti-Biofilm Agents I: Antibiotics versus Bacteriophages. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 Sep 9; 8 (3): 525–58. DOI: 10.3390/ph8030525.
 56. Gabisoniya TG, Loladze MZ, Nadiradze MM, Chakhunashvili NK, Alibegashvili MG, Tamarashvili NG et al. Effects of bacteriophages on biofilm formation by strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Microbiol*. 2016; 52: 293–7.
 57. Motlagh AM, Bhattacharjee AS, Goel R. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016 Apr; 32 (4): 67. DOI: 10.1007/s11274-016-2009-4.
 58. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Sep; 68 (3): 560–602. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004.
 59. Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr Opin Microbiol*. 2015 Feb; 23: 171–8. DOI: 10.1016/j.mib.2014.11.019.
 60. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013 Jul 11; 499 (7457): 219–22. DOI: 10.1038/nature12212.
 61. Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58 (1): 606–9. DOI: 10.1128/AAC.01684-13.
 62. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One*. 2011 Mar 3; 6 (3): e17549. DOI: 10.1371/journal.pone.0017549.
 63. Davis BM, Waldor MK. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Feb; 6 (1): 35–42.
 64. Broudy TB, Fischetti VA. In Vivo Lysogenic Conversion of *Tox*-*Streptococcus pyogenes* to *Tox*+ with Lysogenic *Streptococci* or Free Phage. *Infect Immun*. 2003 Jul; 71 (7): 3782–6. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3782-3786.2003.
 65. Wang X, Wood TK. Cryptic prophages as targets for drug development. *Drug Resist Updat*. 2016 Jul; 27: 30–8. DOI: 10.1016/j.drug.2016.06.001.
 66. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev*. 2004 May; 28 (2): 127–81. DOI: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.
 67. Krylov VN, Pleteneva EL, Bourkaltseva M, Shaburova O, Volckaert G, Sykilinda N et al. Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway. *Res Microbiol*. 2003 May; 154 (4): 269–75. DOI: 10.1016/S0923-2508(03)00070-6.
 68. Mesyanzhinov VV, Robben J, Grymonprez B, Kostyuchenko VA, Burkaltseva MV, Sykilinda NN et al. The genome of bacteriophage fKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol*. 2002 Mar 15; 317 (1): 1–19. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5396.
 69. Hertveldt K, Lavigne R, Pleteneva E, Sernova N, Kurochkina L, Korchevskii R et al. Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *J Mol Biol*. 2005 Dec 2; 354 (3): 536–45. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.08.075.
 70. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999 Mar; 63 (1): 174–229.
 71. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*. 1999 Aug; 181 (16): 4725–33.
 72. Delbrück M. The Growth of Bacteriophage and Lysis of the Host. *J Gen Physiol*. 1940; 23 (5): 643–60.
 73. Leiman PG, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell*. 2004 Aug 20; 118 (4): 419–29. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.022.
 74. Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F et al. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature*. 2002 Jan 31; 415 (6871): 553–7. DOI: 10.1038/415553a.
 75. Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*. 2015 Jul-Sep; 5 (3): e1062590. DOI: 10.1080/21597081.2015.1062590.
 76. Young R. Phage lysis: do we have the hole story yet? *Curr Opin Microbiol*. 2013 Dec; 16 (6): 790–7. DOI: 10.1016/j.mib.2013.08.008.
 77. Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol*. 2014 Mar; 52 (3): 243–58. DOI: 10.1007/s12275-014-4087-z.
 78. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. 1991 Dec 1; 280 (Pt 2): 309–16.
 79. Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*. 1996 Jun 1; 316 (Pt 2): 695–6.
 80. Blackburn NT, Clarke AJ. Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J Mol Evol*. 2001 Jan; 52 (1): 78–84.
 81. Höltje JV. Lytic transglycosylases. *EXS*. 1996; 75: 425–9.
 82. Fastrez J. Phage lysozymes. *EXS*. 1996; 75: 35–64.
 83. Weaver LH, Grütter MG, Remington SJ, Gray TM, Isaacs NW, Matthews BW. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. *J Mol Evol*. 1984–1985; 21 (2): 97–111.
 84. Monzingo AF, Marcotte EM, Hart PJ, Robertus JD. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nat Struct Biol*. 1996 Feb; 3 (2): 133–40.
 85. Jaeger T, Arsic M, Mayer C. Scission of the lactyl ether bond of N-acetylmuramic acid by *Escherichia coli* "etherase". *J Biol Chem*. 2005 Aug 26; 280 (34): 30100–6. DOI: 10.1074/jbc.M502208200.
 86. Díaz E, López R, García JL. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Oct; 87 (20): 8125–9.
 87. Desiere F, Lucchini S, Brüssow H. Evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage genomes by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions. *Virology*. 1998 Feb 15; 241 (2): 345–56.
 88. Sheehan MM, Stanley E, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Identification and Characterization of a Lysis Module Present in a Large Proportion of Bacteriophages Infecting *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Feb; 65 (2): 569–77.

89. Hermoso JA, Monterroso B, Albert A, Galán B, Ahrazem O, García P, et al. Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure*. 2003 Oct; 11 (10): 1239–49.
90. López R, García E, García P, García JL. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? *Microb Drug Resist*. 1997 Summer; 3 (2): 199–211.
91. Gilmer DB, Schmitz JE, Euler CW, Fischetti VA. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jun; 57 (6): 2743–50. DOI: 10.1128/AAC.02526-12.
92. Yang H, Wang DB, Dong Q, Zhang Z, Cui Z, Deng J et al. Existence of separate domains in lysin PlyG for recognizing *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Oct; 56 (10): 5031–9. DOI: 10.1128/AAC.00891-12.
93. Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan; 47 (1): 375–7. DOI: 10.1128/AAC.47.1.375-377.2003.
94. Fischetti VA Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol*. 2005 Oct; 13 (10): 491–6. DOI: 10.1016/j.tim.2005.08.007.
95. Yang H, Zhang Y, Yu J, Huang Y, Zhang XE, Wei H. Novel chimeric lysin with high-level antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58 (1): 536–42. DOI: 10.1128/AAC.01793-13.
96. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Mar; 49 (3): 1225–8. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1225-1228.2005.
97. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol*. 2012 Oct; 7 (10): 1147–71. DOI: 10.2217/fmb.12.97.

References

1. Nazarov PA. Chelovechestvo mozhet vyigrat' voynu protiv bakteriy. *Kommersant Nauka*. 2017; (5): 20–2. Russian.
2. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2015. 21 p. Available from: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb; 16 (2): 161–8. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
4. Pader V, Hakim S, Painter KL, Wigneshweraraj S, Clarke TB, Edwards AM. *Staphylococcus aureus* inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids. *Nat Microbiol*. 2016 Oct 24; 2: 16194. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.194.
5. Chen L, Todd R, Kiehlbauch J, Walters M, Kallen A. Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* — Washoe County, Nevada, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017 Jan 13; 66 (1): 33. DOI: 10.15585/mmwr.mm6601a7.
6. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2017. 48 p. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=1>.
7. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jun; 8 (6): 423–35. DOI: 10.1038/nrmicro2333.
8. Baltz RH. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. *Microbe*. 2007; 2 (3): 125–31.
9. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 May; 12 (5): 371–87. DOI: 10.1038/nrd3975.
10. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015 Jan 22; 517 (7535): 455–9. DOI: 10.1038/nature14098.
11. Dibrov P, Dibrov E, Maddaford TG, Kenneth M, Nelson J, Resch C et al. Development of a novel rationally designed antibiotic to inhibit a nontraditional bacterial target. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017 May; 95 (5): 595–603. DOI: 10.1193/cjpp-2016-0505.
12. Hards K, Cook GM. Targeting bacterial energetics to produce new antimicrobials. *Drug Resistance Updates*. 2018; 36: 1–12.
13. Jones D. Tuberculosis success. *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12 (3): 175–6.
14. Khailova LS, Nazarov PA, Sumbatyan NV, Korshunova GA, Rokitskaya TI, Dedukhova VI et al. Uncoupling and Toxic Action of Alkyltriphenylphosphonium Cations on Mitochondria and the Bacterium *Bacillus subtilis* as a Function of Alkyl Chain Length. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Dec; 80 (12): 1589–97. DOI: 10.1134/S000629791512007X.
15. Nazarov PA, Osterman IA, Tokarchuk AV, Karakozova MV, Korshunova GA, Lyamzaev KG et al. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci Rep*. 2017 May 3; 7 (1): 1394. DOI: 10.1038/s41598-017-00802-8.
16. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb; 16 (2): 239–51. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00466-1.
17. Ladhani SN, Campbell H, Parikh SR, Saliba V, Borrow R, Ramsay M. The introduction of the meningococcal B (MenB) vaccine (Bexsero®) into the national infant immunisation programme—New challenges for public health. *J Infect*. 2015 Dec; 71 (6): 611–4. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.09.035.
18. DiGiandomenico A, Sellman BR. Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation? *Curr Opin Microbiol*. 2015 Oct; 27: 78–85. DOI: 10.1016/j.mib.2015.07.014.
19. Babcock GJ, Broering TJ, Hernandez HJ, Mandell RB, Donahue K, Boatright N et al. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. *Infect Immun*. 2006 Nov; 74 (11): 6339–47. DOI: 10.1128/IAI.00982-06.
20. Foletti D, Strop P, Shaughnessy L, Hasa-Moreno A, Casas MG, Russell M et al. Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin. *J Mol Biol*. 2013 May 27; 425 (10): 1641–54. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.008.
21. Oganessian V, Peng L, Damschroder MM, Cheng L, Sadowska A, Tkaczyk C et al. Mechanisms of neutralization of a human anti-alpha toxin antibody. *J Biol Chem*. 2014 Oct 24; 289 (43): 29874–80. DOI: 10.1017/jbc.M114.601328.
22. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN et al. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med*. 2010 Jan 21; 362 (3): 197–205. DOI: 10.1056/NEJMoa0907635.
23. Szijártó V, Lukaszewicz J, Gozdiewicz TK, Magyarics Z, Nagy E, Nagy G. Diagnostic potential of monoclonal antibodies specific to the unique O-antigen of multidrug-resistant epidemic *Escherichia coli* clone ST131-O25b:H4. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Jul; 21 (7): 930–9. DOI: 10.1128/CVI.00685-13.
24. Kelly-Quintos C, Cavacini LA, Posner MR, Goldmann D, Pier GB. Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine. *Infect Immun*. 2006 May; 74 (5): 2742–50. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2742-2750.2006.

25. Hazenbos WL, Kajihara KK, Vandlen R, Morisaki JH, Lehar SM, Kwakkenbos MJ et al. Novel staphylococcal glycosyltransferases SdgA and SdgB mediate immunogenicity and protection of virulence-associated cell wall proteins. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (10): e1003653. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003653.
26. Palliyil S, Downham C, Broadbent I, Charlton K, Porter AJ. High-sensitivity monoclonal antibodies specific for homoserine lactones protect mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Jan; 80 (2): 462–9. DOI: 10.1128/AEM.02912-13.
27. Palliyil S. Generation of High-Sensitivity Monoclonal Antibodies Specific for Homoserine Lactones. *Methods Mol Biol.* 2018; 1673: 325–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-7309-5_25.
28. Varshney AK, Wang X, MacIntyre J, Zollner RS, Kelleher K, Kovalenko OV et al. Humanized staphylococcal enterotoxin B (SEB)-specific monoclonal antibodies protect from SEB intoxication and *Staphylococcus aureus* infections alone or as adjunctive therapy with vancomycin. *J Infect Dis.* 2014 Sep 15; 210 (6): 973–81. DOI: 10.1093/infdis/jiu198.
29. Hilliard JJ, Datta V, Tkaczyk C, Hamilton M, Sadowska A, Jones-Nelson O et al. Anti- α toxin monoclonal antibody and antibiotic combination therapy improves disease outcome and accelerates healing in a *Staphylococcus aureus* dermonecrosis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan; 59 (1): 299–309. DOI: 10.1128/AAC.03918-14.
30. Zou L, Liu M, Wang Y, Lu J, Pang Y. Determination of in vitro synergy between linezolid and other antimicrobial agents against *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Tuberculosis (Edinb).* 2015 Dec; 95 (6): 839–42. DOI: 10.1016/j.tube.2015.07.003.
31. Berditsch M, Jäger T, Stempel N, Schwartz T, Overhage J, Ulrich AS. Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin B and gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Sep; 59 (9): 5288–96. DOI: 10.1128/AAC.00682-15.
32. Krishnamoorthy G, Leus IV, Weeks JW, Wolloscheck D, Rybenkov VV, Zgurskaya HI. Synergy between Active Efflux and Outer Membrane Diffusion Defines Rules of Antibiotic Permeation into Gram-Negative Bacteria. *MBio.* 2017; 8 (5): e01172-17. DOI: 10.1128/mBio.01172-17.
33. Omarova EO, Nazarov PA, Firsov AM, Strakhovskaya MG, Arkhipova AY, Moiseyevich MM et al. Carboranyl-Chlorin e6 as a Potent Antimicrobial Photosensitizer. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0141990. DOI: 10.1371/journal.pone.0141990.
34. Maliszewska I, Kalas W, Wysokińska E, Tylus W, Pietrzyk N, Popko K et al. Enhancement of photo-bactericidal effect of tetrasulfonated hydroxylaluminum phthalocyanine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan; 33 (1): 79–88. DOI: 10.1007/s10103-017-2337-0.
35. Fekrazad R, Zare H, Vand SM. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016 Sep; 15: 213–7. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.001.
36. Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2013 Aug; 8 (2): 108–20.
37. Miroshnikov KA, Chertkov OV, Nazarov PA, Mesyanzhinov VV. Peptido-glikanliziruyushchie fermenty bakteriofagov — perspektivnye protivobakterial'nye agenty. *Uspekhi biologicheskoy khimii.* 2006; 46: 65–98. Russian.
38. Suttle CA. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Oct; 5 (10): 801–12. DOI: 10.1038/nrmicro1750.
39. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* 2014 Jan 1; 5 (1): 226–35. DOI: 10.4161/viru.25991.
40. Twort FW. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet.* 1915 Dec 4; (4814): 1241–3.
41. D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci (Paris).* 1917; 165: 373–5. French.
42. Bruynoghe R., Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. *C R Soc Biol.* 1921; 85: 1120–1. French.
43. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol.* 1997 Jul; 5 (7): 268–71. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01054-8.
44. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Mar; 45 (3): 649–59. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
45. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol.* 2006 Feb; 296 (1): 5–14. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.09.002.
46. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2017 Aug 6; 8 (3): 162–173. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
47. Levin B, Bull JJ. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *Am Naturalist.* 1996; 147: 881–98.
48. Rea K, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol Stress.* 2016 Oct; 4: 23–33. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.03.001.
49. Mai V, Ukhanova M, Reinhard MK, Li M, Sulakvelidze A. Bacteriophage administration significantly reduces *Shigella* colonization and shedding by *Shigella*-challenged mice without deleterious side effects and distortions in the gut microbiota. *Bacteriophage.* 2015 Aug; 5 (4): e1088124. DOI: 10.10180/21597081.2015.1088124.
50. Galtier M, De Sordi L, Maura D, Arachchi H, Volant S, Dillies MA et al. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environ Microbiol.* 2016 Jul; 18 (7): 2237–45. DOI: 10.1111/1462-2920.13284.
51. Servick K. Drug development. Beleaguerd phage therapy trial presses on. *Science.* 2016 Jun 24; 352 (6293): 1506. DOI: 10.1126/science.352.6293.1506.
52. Bourdin G, Navarro A, Sarker SA, Pittet AC, Qadri F, Sultana S et al. Coverage of diarrhoea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails. *Microb Biotechnol.* 2014 Mar; 7 (2): 165–76. DOI: 10.1111/1751-7915.12113.
53. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea with Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children from Bangladesh. *EBioMedicine.* 2016 Jan 5; 4: 124–37. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.12.023.
54. Latz S, Wahida A, Arif A, Häfner H, Hoß M, Ritter K et al. Preliminary survey of local bacteriophages with lytic activity against multi-drug resistant bacteria. *J Basic Microbiol.* 2016 Oct; 56 (10): 1117–23. DOI: 10.1002/jbm.201600108.
55. Abedon ST. Ecology of Anti-Biofilm Agents I: Antibiotics versus Bacteriophages. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015 Sep 9; 8 (3): 525–58. DOI: 10.3390/ph8030525.
56. Gabisoniya TG, Loladze MZ, Nadiradze MM, Chakhunashvili NK, Alibegashvili MG, Tamarashvili NG et al. Effects of bacteriophages on biofilm formation by strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Microbiol.* 2016; 52: 293–7.
57. Motlagh AM, Bhattacharjee AS, Goel R. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016 Apr; 32 (4): 67. DOI: 10.1007/s11274-016-2009-4.
58. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Sep; 68 (3): 560–602. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004.
59. Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr Opin Microbiol.* 2015 Feb; 23: 171–8. DOI: 10.1016/j.mib.2014.11.019.
60. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature.* 2013 Jul 11; 499 (7457): 219–22. DOI: 10.1038/nature12212.
61. Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J et al. Antibiotic resistance genes in the

- bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (1): 606–9. DOI: 10.1128/AAC.01684-13.
62. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One.* 2011 Mar 3; 6 (3): e17549. DOI: 10.1371/journal.pone.0017549.
 63. Davis BM, Waldor MK. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol.* 2003 Feb; 6 (1): 35–42.
 64. Broudy TB, Fischetti VA. In Vivo Lysogenic Conversion of Tox-*Streptococcus pyogenes* to Tox+ with Lysogenic *Streptococci* or Free Phage. *Infect Immun.* 2003 Jul; 71 (7): 3782–6. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3782-3786.2003.
 65. Wang X, Wood TK. Cryptic prophages as targets for drug development. *Drug Resist Updat.* 2016 Jul; 27: 30–8. DOI: 10.1016/j.drup.2016.06.001.
 66. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 2004 May; 28 (2): 127–81. DOI: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.
 67. Krylov VN, Pleteneva EL, Bourkaltseva M, Shaburova O, Volckaert G, Sykilinda N et al. Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway. *Res Microbiol.* 2003 May; 154 (4): 269–75. DOI: 10.1016/S0923-2508(03)00070-6.
 68. Mesyanzhinov VV, Robben J, Grymonprez B, Kostyuchenko VA, Burkaltseva MV, Sykilinda NN et al. The genome of bacteriophage fKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol.* 2002 Mar 15; 317 (1): 1–19. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5396.
 69. Hertveldt K, Lavigne R, Pleteneva E, Sernova N, Kurochkina L, Korchevskii R et al. Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *J Mol Biol.* 2005 Dec 2; 354 (3): 536–45. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.08.075.
 70. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Mar; 63 (1): 174–229.
 71. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1999 Aug; 181 (16): 4725–33.
 72. Delbrück M. The Growth of Bacteriophage and Lysis of the Host. *J Gen Physiol.* 1940; 23 (5): 643–60.
 73. Leiman PG, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell.* 2004 Aug 20; 118 (4): 419–29. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.022.
 74. Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F et al. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature.* 2002 Jan 31; 415 (6871): 553–7. DOI: 10.1038/415553a.
 75. Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage.* 2015 Jul-Sep; 5 (3): e1062590. DOI: 10.1080/21597081.2015.1062590.
 76. Young R. Phage lysis: do we have the hole story yet? *Curr Opin Microbiol.* 2013 Dec; 16 (6): 790–7. DOI: 10.1016/j.mib.2013.08.008.
 77. Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol.* 2014 Mar; 52 (3): 243–58. DOI: 10.1007/s12275-014-4087-z.
 78. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 1991 Dec 1; 280 (Pt 2): 309–16.
 79. Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 1996 Jun 1; 316 (Pt 2): 695–6.
 80. Blackburn NT, Clarke AJ. Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J Mol Evol.* 2001 Jan; 52 (1): 78–84.
 81. Höltje JV. Lytic transglycosylases. *EXS.* 1996; 75: 425–9.
 82. Fastrez J. Phage lysozymes. *EXS.* 1996; 75: 35–64.
 83. Weaver LH, Grütter MG, Remington SJ, Gray TM, Isaacs NW, Matthews BW. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. *J Mol Evol.* 1984–1985; 21 (2): 97–111.
 84. Monzingo AF, Marcotte EM, Hart PJ, Robertus JD. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nat Struct Biol.* 1996 Feb; 3 (2): 133–40.
 85. Jaeger T, Arsic M, Mayer C. Scission of the lactyl ether bond of N-acetylmuramic acid by *Escherichia coli* "etherase". *J Biol Chem.* 2005 Aug 26; 280 (34): 30100–6. DOI: 10.1074/jbc.M502208200.
 86. Díaz E, López R, García JL. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Oct; 87 (20): 8125–9.
 87. Desiere F, Lucchini S, Brüssow H. Evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage genomes by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions. *Virology.* 1998 Feb 15; 241 (2): 345–56.
 88. Sheehan MM, Stanley E, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Identification and Characterization of a Lysis Module Present in a Large Proportion of Bacteriophages Infecting *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Feb; 65 (2): 569–77.
 89. Hermoso JA, Monterroso B, Albert A, Galán B, Ahrazem O, García P, et al. Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure.* 2003 Oct; 11 (10): 1239–49.
 90. López R, García E, García P, García JL. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? *Microb Drug Resist.* 1997 Summer; 3 (2): 199–211.
 91. Gilmer DB, Schmitz JE, Euler CW, Fischetti VA. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun; 57 (6): 2743–50. DOI: 10.1128/AAC.02526-12.
 92. Yang H, Wang DB, Dong Q, Zhang Z, Cui Z, Deng J et al. Existence of separate domains in lysin PlyG for recognizing *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Oct; 56 (10): 5031–9. DOI: 10.1128/AAC.00891-12.
 93. Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan; 47 (1): 375–7. DOI: 10.1128/AAC.47.1.375-377.2003.
 94. Fischetti VA Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* 2005 Oct; 13 (10): 491–6. DOI: 10.1016/j.tim.2005.08.007.
 95. Yang H, Zhang Y, Yu J, Huang Y, Zhang XE, Wei H. Novel chimeric lysin with high-level antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (1): 536–42. DOI: 10.1128/AAC.01793-13.
 96. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Mar; 49 (3): 1225–8. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1225-1228.2005.
 97. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012 Oct; 7 (10): 1147–71. DOI: 10.2217/fmb.12.97.

ПРОИЗВОДНЫЕ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЯ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ОБЫЧНЫМ АНТИБИОТИКАМ

Т. К. А. Пинто¹, А. Банержи², П. А. Назаров³ ✉

¹ Институт Микробиологии им. Пауло де Гоэша, Федеральный университет Рио-де-Жанейро, Рио-де-Жанейро, Бразилия

² Отделение биологических наук и биоинжиниринга, Индийский технологический институт, Мумбай, Индия

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

В связи с тем, что наиболее распространенные патогены постоянно эволюционируют, приобретая устойчивость ко все большему числу антибиотиков, в настоящее время существует острая потребность в новых антимикробных препаратах и стратегиях лечения инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями. Хотя в понимании патогенеза подобных инфекций удалось значительно продвинуться, стратегий для борьбы с ними не так много. Недавно было показано, что SkQ1, антиоксидант и антибиотик на основе трифенилфосфония, воздействующий на митохондрии, эффективен в отношении грамположительных лабораторных штаммов, включая *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium sp.* Более того, SkQ1 также показал эффективность в отношении грамотрицательных штаммов за исключением *Escherichia coli*. Механизм бактерицидного действия трифенилфосфониевых соединений можно объяснить их способностью вызывать нарушения энергетического обмена у бактерий за счет резкого снижения мембранного потенциала путем стимуляции протонотического разобщения. На текущий момент случаи устойчивости к SkQ1 среди грамположительных бактерий не зафиксированы, поэтому антимикробные препараты на основе трифенилфосфония могут быть эффективно использованы для борьбы с планктонными и сессильными клиническими штаммами, нечувствительными к обычным антибиотикам.

Ключевые слова: трифенилфосфоний, протонотический, бактерии, устойчивость к антибиотикам, клинические штаммы, потенциал мембраны, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*

Благодарности: авторы благодарят доктора биологических наук Ю. Н. Антоненко и кандидата биологических наук М. В. Скулачева за ценные критические замечания и обсуждение этой работы.

✉ Для корреспонденции: Назаров Павел Александрович
ул. Наримановская, д. 22, к. 3, кв. 264, г. Москва, 107564; nazarovpa@gmail.com

Статья получена: 23.01.2018 Статья принята к печати: 01.02.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.003

TRIPHENYL PHOSPHONIUM-BASED SUBSTANCES ARE ALTERNATIVES TO COMMON ANTIBIOTICS

Pinto TCA¹, Banerjee A², Nazarov PA³ ✉

¹ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Department of Biosciences & Bioengineering, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai, India

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

There is an urgent need for new antimicrobial and therapeutic strategies to deal with the ever evolving antimicrobial resistance among the most prevalent bacterial pathogens. Infections due to virulent bacteria remain significant causes of morbidity and mortality despite progress in antimicrobial therapy, primarily because of the increasing of antimicrobial resistance levels among such group of bacteria. Despite significant advances in the understanding of the pathogenesis of infection due to these organisms, there are only limited strategies to prevent infection. Recently it was reported that SkQ1, triphenyl phosphonium-based mitochondria-targeted antioxidant and antibiotic, effectively kills all tested Gram-positive laboratory strains including of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium sp.* Moreover, SkQ1 demonstrated effectiveness towards Gram-negative strains too, except *Escherichia coli*. The mechanism of the bactericidal action of TPP-based antibiotics could be also described by its ability to suppress bacterial bioenergetics by collapsing membrane potential through activation of protonophorous uncoupling. To this date, there are no reports of resistance to SkQ1 among Gram-positive strains; therefore, triphenyl phosphonium-based antibacterial agents would be effective towards planktonic and sessile cells of clinical resistant strains.

Keywords: triphenyl phosphonium, protonophore, bacteria, antibiotic resistance, clinical strains, membrane potential, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*

Acknowledgement: we are grateful to Dr. Y. N. Antonenko and Dr. M. V. Skulachev for critical reading and helpful discussion of the manuscript.

✉ Correspondence should be addressed: Pavel Nazarov
ul. Narimanovskaya, d. 22, k. 3, kv. 294, Moscow, Russia, 107564; nazarovpa@gmail.com

Received: 23.01.2018 Accepted: 01.02.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.003

Устойчивость бактерий к антимикробным препаратам — серьезный вызов для современного здравоохранения. Систематическое злоупотребление антибиотиками в медицине и пищевой промышленности ставит под угрозу население всех стран. Необходимы решительные и безотлагательные меры глобального масштаба, иначе человечество рискует оказаться на пороге нового времени, в котором обычная и незначительная инфекция может вновь оказаться смертельной [1].

Из-за повсеместно наблюдаемой устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам вариантов лечения бактериальных инфекций становится все меньше. Бактериальная резистентность сказывается на всех аспектах здоровья. Последствия инфекции, вызываемой резистентными штаммами, могут быть крайне тяжелыми.

В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения опубликовала список устойчивых к антибиотикам «приоритетных патогенов» [2], который должен был стать ориентиром в деле разработки новых препаратов против существующих инфекций. Угрожающей становится ситуация с грамположительными бактериями *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecium*, вызывающими как внебольничные, так и госпитальные инфекции. Эти бактерии, которые в принципе являются нормальными компонентами животной и человеческой микрофлоры, обладают широким спектром вирулентных факторов, обеспечивающих успешную колонизацию хозяина и помогающих бактериям защищаться от иммунного ответа. Одним из факторов вирулентности, способствующим развитию инфекции, является способность бактерий формировать биопленки на органических (кости, сердечный клапан) и синтетических (катетеры, протезы или иные медицинские приспособления) поверхностях [3–5]. Биопленки — это оседлые (сессильные) сообщества микроорганизмов, которые прочно прикрепляются к поверхности и/или другим клеткам и встраиваются в защитный внеклеточный полимерный матрикс. В процессе формирования биопленок микроорганизмы претерпевают ряд фенотипических изменений, включая потерю подвижности, снижение скорости роста, усиление способности к адгезии и устойчивость к антибиотикам и иммунному ответу [6]. Таким образом, бактериальные биопленки могут быть ассоциированы с хроническими или рецидивирующими инфекциями. Способность формировать биопленки и быстро приобретать устойчивость к антибиотикам, наблюдаемая у некоторых штаммов *S. pneumoniae*, *S. aureus* и *E. faecium*, значительно сужает круг возможных вариантов лечения вызываемых ими инфекций. В связи с этим разработка новых терапевтических подходов становится необходимостью.

Staphylococcus aureus

Золотистый стафилококк — это опасный патоген, основной возбудитель инфекций мягких тканей, а также гемоконтактных и девайс-ассоциированных инфекций у взрослых и детей. На данный момент *S. aureus* является самым распространенным патогеном, присутствующим в отделениях интенсивной терапии в США [7]. Кроме того, *S. aureus* — второй по частоте встречаемости возбудитель инфекций, регистрируемых у амбулаторных больных [8]. В то же время у 20 % населения он обитает на коже и в ноздрях, не вызывая клинических симптомов [9]. Инфицированию стафилококком способствуют нарушение целостности слизистой или кожных покровов, наличие

имплантатов, хирургическое вмешательство, гемодиализ и ослабленный иммунитет. Устойчивость изолятов золотистого стафилококка к антибиотикам, в частности, к метициллину, является актуальной проблемой в современном здравоохранении, поскольку она затрудняет лечение и профилактику стафилококковых инфекций. С момента первых сообщений о метициллин-устойчивом (MRSA) штамме в 1960-х гг. количество новых случаев инфицирования этим патогеном неуклонно растет. MRSA обнаруживается почти в 50 % случаев всех нозокомиальных инфекций, вызванных золотистым стафилококком, в частности, развивающихся на прооперированных участках тела или ассоциированных с применением мочевых катетеров. Устойчивость к метициллину и прочим бета-лактамам — следствие приобретения патогеном генной кассеты *mecA*, которая приводит к некоторым изменениям в пенициллин-связывающих белках клеточной стенки [10]. В контексте антибиотикорезистентности большое беспокойство вызывает недавнее появление штаммов *S. aureus*, устойчивых к ванкомицину (VRSA) или обладающих сниженной чувствительностью к нему (VISA). За период с 2004 по 2009 гг. доля штаммов, устойчивых к метициллину, обладающих при этом сниженной чувствительностью к ванкомицину, увеличилась почти вдвое [11].

Enterococcus sp.

В последние десятилетия значительно возросла клиническая значимость энтерококков как возбудителей нозокомиальных инфекций. Энтерококк — третий по распространенности в больничных отделениях условно-патогенный микроорганизм, на долю которого приходится около 12 % всех госпитальных инфекций [12]. При этом *Enterococcus* является нормальным компонентом кишечной микрофлоры человека и животных. Из всех энтерококковых штаммов, колонизирующих и инфицирующих человека, основная доля приходится на *E. faecalis* и *E. faecium*. Изоляты энтерококка часто имеют множественную устойчивость к антимикробным препаратам. Учитывая высокую способность патогена к диссеминации, особенно критичной представляется его устойчивость к ванкомицину [13]. Она наиболее типична для *E. faecium* и опосредуется приобретением группы генов, составляющих кластер *van*. Эти гены расположены на транспозоне и кодируют модификацию клеточной стенки, которая приводит к снижению сродства к ванкомицину. Важно, что изоляты штаммов энтерококка, нечувствительных к ванкомицину (VRE), являются резервуарами генов антимикробной устойчивости, которые могут передаваться другим видам, включая *S. aureus*. Так, штаммы стафилококка со сниженной чувствительностью к ванкомицину получили кластер *van* от изолятов энтерококка [14]. Примерно у 8 % пациентов, колонизированных ванкомицин-резистентным патогеном, инфекция развивается во время пребывания в больнице [15]; смертность от подобных инфекций остается высокой, варьируя от 13 до 46 % [16]. Штаммы VRE обычно ассоциируют с инфекциями брюшной полости, кожи, мягких тканей, мочевыводящих путей, крови и эндокардитами. Часто инфекцию переносят медицинские работники. Заразившись однажды, пациент может страдать от инфекции в течение всей жизни. Примерно треть известных случаев заражения энтерококками связана со штаммами, устойчивыми к ванкомицину. Поэтому эффективность терапии существующими антимикробными препаратами в данном случае является сомнительной, что выводит на

первый план необходимость мер по предотвращению передачи этого патогена.

Streptococcus pneumoniae

S. pneumoniae, или пневмококк, является клинически значимым патогеном человека, ведущей причиной внебольничных пневмоний и одним из основных возбудителей бактериального менингита. Этот микроорганизм может бессимптомно обитать в носоглотке здоровых людей, но при попадании в мозг, легкие, кровоток и прочие стерильные органы может вызвать серьезные поражения, особенно у пожилых людей и маленьких детей, иммунитет которых ослаблен или не полностью сформирован. Нечувствительный к пенициллину пневмококк (PNSP) — один из самых опасных патогенов, угрожающий здоровью каждой нации [2, 17]. Рост числа изолятов PNSP с момента первоначального их обнаружения в 1960-х гг. вызывает серьезное беспокойство. Эти изоляты обычно устойчивы к бета-лактамам и возникают в результате мутаций в генах, кодирующих пенициллин-связывающий белок, за счет чего и уменьшается сродство этого белка к бета-лактамам. Кроме нечувствительных к бета-лактамам штаммов в последнее время в разных регионах мира регистрируют пневмококки, устойчивые к макролидам; они составляют до 40 % от всех пневмококковых изолятов, выделяемых у европейского населения [18] и более 70 % — от штаммов, распространенных в Азии. Устойчивость к макролидам в основном определяется изменениями на участке рибосомы, который является мишенью для антимикробных препаратов, но также может возникать из-за модификации самого препарата или механизма его доставки [19]. Устойчивость *S. pneumoniae* к антибиотикам развилась во многом из-за повсеместного использования антибиотиков и применения пневмококковых конъюгированных вакцин.

Энергетический метаболизм бактерии — мишень для новых антимикробных препаратов

Энергетический метаболизм привязан к клеточной мембране, которая функционирует как барьер, преобразующий энергию электрохимического градиента в чистую химическую энергию, удовлетворяющую потребностям клет-

ки. Электрохимический градиент протон-движущей силы (ПДС) необходим всем бактериям для поддержания самых разнообразных процессов, включая синтез АТФ и доставку питательных элементов из окружающей среды для роста и метаболической активности. Более того, выработка ПДС является эволюционно консервативным процессом, который наличествовал даже у последнего общего универсального предка (LUCA) [20, 21].

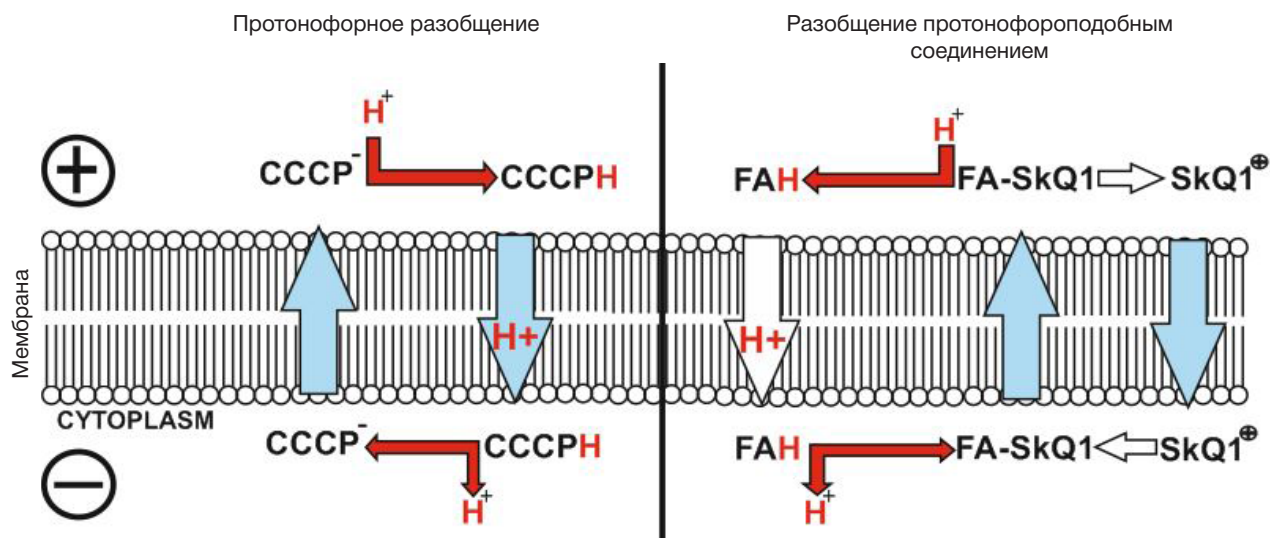
Некоторые химические соединения, включая грамицидин, могут разрушать мембрану, образуя в ней поры и, как следствие, снижая электрохимический градиент. Соединения, которые называются протонофорами, могут уменьшать градиент путем специфического связывания ионов водорода, участвующих в протонофорном цикле на мембране (рисунок, слева). Существует еще одна группа химических агентов, способных уменьшать градиент: это протонофороподобные соединения, переносящие через мембрану вещества, связывающие ионы водорода (рисунок, справа), например жирные кислоты [22].

В связи с вышесказанным энергетический метаболизм бактерий может стать хорошей мишенью для новых антимикробных препаратов, стимулирующих холостые метаболические циклы, что предположительно не должно привести к развитию устойчивости, но будет эффективным в борьбе с резистентными к антибиотикам штаммами.

Соединения на основе трифенилфосфония

Четвертичные производные аммония и фосфония используются в качестве антисептиков и дезинфектантов уже не одно десятилетие [23–28]. Недавно были разработаны вещества, имеющие в своем составе антиоксидантную группу и компонент, воздействующий на митохондрии. Примером таких соединений являются конъюгированные с трифенилом фосфония убихинон (MitoQ) [29] и пластохинон (SkQ1) [30]. В недавних работах сообщается, что эти соединения успешно уничтожают бактерии *Bacillus subtilis* [31, 32]. Более того, SkQ1 показал свою эффективность в борьбе против некоторых грамотрицательных бактерий (за исключением *Escherichia coli*) и различных грамположительных видов, включая *S. aureus* и *Mycobacterium sp.*

Механизм бактерицидного действия антибиотика SkQ1 можно объяснить способностью последнего нарушать



Протонофорный цикл с участием протонофорного разобщителя CCCP, протонофороподобного соединения SkQ1 на основе трифенилфосфония и жирных кислот (FA)

энергетический обмен бактерии в результате протонного разобщения, которое приводит к резкому падению мембранного потенциала. В экспериментах *in silico* было обнаружено, что некоторые антибактериальные соединения, применяемые для лечения паразитарных инфекций, одновременно являются разобщителями энергетического метаболизма бактерий [33]. Более того, было показано, что триклозан, довольно распространенный антимикробный препарат широкого спектра действия, вызывает у бактерий коллапс мембранного потенциала и одновременно подавляет редуктазу еноил-ацил переносающего белка, которая является одним из ключевых участников синтеза жирных кислот у бактерий [34].

SkQ1 содержит не только эффективный антимикробный компонент, но и антиоксидантную часть, воздействующую на активные формы кислорода в митохондриях. Поэтому SkQ1 можно считать новым видом гибридного антибиотика двойного действия. Отсутствие токсичности этого вещества в дозе 1–2 μM для клеток человека и животных означает, что SkQ1 является безопасным антимикробным средством, которое, с одной стороны, унич-

тожает патоген, а с другой — способствует регенерации поврежденных клеток организма.

Подобные соединения могли бы применяться для лечения бактериальных инфекций, сопровождаемых формированием биопленок. На сегодняшний день нет никаких сообщений о развитии резистентности к SkQ1 и производным трифенилфосфония среди грамположительных микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

Современный уровень знаний о механизмах развития бактериальной устойчивости к антибиотикам и о биоэнергетических процессах у бактерий позволяет предположить, что соединения на основе трифенилфосфония могут стать альтернативой в лечении инфекций, вызываемых резистентными к антибиотикам бактериями. Эти препараты олицетворяют новый подход к лечению бактериальных инфекций, который поможет победить устойчивость бактерий к антибиотикам и снизить уровень смертности от вызываемых ими инфекций.

Литература

- World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2015. 21 p. Available from: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
- World Health Organization [Internet]. c2018– [cited 2018 Jan] Antibiotic-resistant priority pathogens list. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>.
- Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2003; 57: 677–701. DOI: 10.1146/annerev.micro.57.030502.090720.
- Barrett L, Atkins B. The clinical presentation of prosthetic joint infection. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Sep; 69 Suppl 1: i25–7. DOI: 10.1093/jac/dku250.
- Chatterjee S, Maiti P, Dey R, Kundu A, Dey R. Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. *Ann Med Health Sci Res*. 2014 Jan; 4 (1): 100–4. DOI: 10.4103/2141-9248.126612.
- Scherr TD, Heim CE, Morrison JM, Kielian T. Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. *Front Immunol*. 2014 Feb 5; 5: 37. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00037.
- Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 1; 46 Suppl 5: S344–9. DOI: 10.1086/533590.
- Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006 Feb 9; 5: 2. DOI: 10.1186/1476-0711-5-2.
- Peacock S.J., de Silva I., Lowy F.D. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol*. 2001 Dec; 9 (12): 605–10.
- Goyal N, Miller A, Tripathi M, Parvizi J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): colonisation and pre-operative screening. *Bone Joint J*. 2013 Jan; 95-B (1): 4–9. DOI: 10.1302/0301-620X.95B1.27973.
- Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Dowzicky M, Babinchak T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004–2009. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Mar; 37 (3): 219–24. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.029.
- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Dawn M, Sievert DM et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29 (11): 996–1011.
- Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 2012 Aug 15; 3 (5): 421–33. DOI: 10.4161/viru.21282.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002 Jul 5; 51 (26): 565–7.
- Nguyen GC, Leung W, Weizman AV. Increased risk of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) infection among patients hospitalized for inflammatory bowel disease in the United States. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jun; 17 (6): 1338–42. DOI: 10.1002/ibd.21519.
- Whang DW, Miller LG, Partain NM, McKinnell JA. Systematic review and meta-analysis of linezolid and daptomycin for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct; 57 (10): 5013–8. DOI: 10.1128/AAC.00714-13.
- Weiner LM, Fridkin SK, Aponte-Torres Z, Avery L., Coffin N., Dudeck MA. et al. Vital Signs: Estimated Effects of a Coordinated Approach for Action to Reduce Antibiotic-Resistant Infections in Health Care Facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 65 (26): 565–7.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2017.
- Cherazard R, Epstein M, Doan TL, Salim T, Bharti S, Smith MA. Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. *Am J Ther*. 2017 May; 24 (3): e361–9. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000551.
- Lane N. Energetics and genetics across the prokaryote-eukaryote divide. *Biol Direct*. 2011; 6: 35. DOI: 10.1186/1745-6150-6-35.
- Sojo V, Pomiankowski A, Lane N. A Bioenergetic Basis for Membrane Divergence in Archaea and Bacteria. *PLoS Biol*. 2014 Aug 12; 12 (8): e1001926. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001926.
- Severin FF, Severina II, Antonenko YN, Rokitskaya TI, Cherepanov DA, Mokhova EN et al. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 12; 107 (2): 663–8. DOI: 10.1073/pnas.0910216107.
- Kanazawa A, Ikeda T, Endo T. Synthesis and antimicrobial activity of dimethyl- and trimethyl-substituted phosphonium salts with alkyl chains of various lengths. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 May; 38 (5): 945–52.

24. Pernak J, Jedraszczak J, Krysiński J. [Quaternary ammonium- and phosphonium compounds against bacteria and fungi]. *Pharmazie*. 1987 Oct; 42 (10): 703–4. German.
25. Galkina I, Bakhtiyarova Y, Andriyashin V, Galkin V, Cherkasov R. Synthesis and Antimicrobial activities of phosphonium salts on basis of triphenylphosphine and 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl bromide. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and Related Elements*. 2013; 188: 15–8.
26. Listvan VN, Listvan VV, Malishevskaya AV, Deineka SY. [Benzylc type triphenylphosphonium salts and their antimicrobial properties]. *Zhurnal organichnoy ta farmatsevtichnoy khimii*. 2008; 6 (24): 77–80. Ukrainian.
27. Martín-Rodríguez AJ, Babarro JM, Lahoz F, Sansón M, Martín VS, Norte M et al. From broad-spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyltriphenylphosphonium salts. *PLoS One*. 2015 Apr 21; 10 (4): e0123652. DOI: 10.1371/journal.pone.0123652.
28. Nikitina EV, Zeldi MI, Pugachev MV, Sapozhnikov SV, Shtyrlin NV, Kuznetsova SV, et al. Antibacterial effects of quaternary bis-phosphonium and ammonium salts of pyridoxine on *Staphylococcus aureus* cells: A single base hitting two distinct targets? *World J Microbiol Biotechnol*. 2016 Jan; 32 (1): 5. DOI: 10.1007/s11274-015-1969-0.
29. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16; 276 (7): 4588–96. DOI: 10.1074/jbc.M009093200.
30. Skulachev VP. A biochemical approach to the problem of aging: “megaproject” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects. *Biochemistry (Mosc)*. 2007 Dec; 72 (12): 1385–96.
31. Khailova LS, Nazarov PA, Sumbatyan NV, Korshunova GA, Rokitskaya TI, Dedukhova VI et al. Uncoupling and toxic action of alkyltriphenylphosphonium cations on mitochondria and the bacterium *Bacillus subtilis* as a function of alkyl chain length. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Dec; 80 (12): 1589–97. DOI: 10.1134/S000629791512007X.
32. Nazarov PA, Osterman IA, Tokarchuk AV, Karakozova MV, Korshunova GA, Lyamzaev KG et al. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci Rep*. 2017 May 3; 7 (1): 1394. DOI: 10.1038/s41598-017-00802-8.
33. Popova LB, Nosikova ES, Kotova EA, Tarasova EO, Nazarov PA, Khailova LS et al. Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2018 Jan 6; 1860 (5): 1000–7. DOI: 10.1016/j.bbame.2018.01.008.

References

1. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2015. 21 p. Available from: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
2. World Health Organization [Internet]. c2018– [cited 2018 Jan] Antibiotic-resistant priority pathogens list. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>.
3. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2003; 57: 677–701. DOI: 10.1146/annerev.micro.57.030502.090720.
4. Barrett L, Atkins B. The clinical presentation of prosthetic joint infection. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Sep; 69 Suppl 1: i25–7. DOI: 10.1093/jac/dku250.
5. Chatterjee S, Maiti P, Dey R, Kundu A, Dey R. Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. *Ann Med Health Sci Res*. 2014 Jan; 4 (1): 100–4. DOI: 10.4103/2141-9248.126612.
6. Scherr TD, Heim CE, Morrison JM, Kielian T. Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. *Front Immunol*. 2014 Feb 5; 5: 37. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00037.
7. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 1; 46 Suppl 5: S344–9. DOI: 10.1086/533590.
8. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006 Feb 9; 5: 2. DOI: 10.1186/1476-0711-5-2.
9. Peacock S.J., de Silva I., Lowy F.D. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol*. 2001 Dec; 9 (12): 605–10.
10. Goyal N, Miller A, Tripathi M, Parvizi J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): colonisation and pre-operative screening. *Bone Joint J*. 2013 Jan; 95-B (1): 4–9. DOI: 10.1302/0301-620X.95B1.27973.
11. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Dowzicky M, Babinchak T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004–2009. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Mar; 37 (3): 219–24. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.029.
12. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Dawn M, Sievert DM et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29 (11): 996–1011.
13. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 2012 Aug 15; 3 (5): 421–33. DOI: 10.4161/viru.21282.
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002 Jul 5; 51 (26): 565–7.
15. Nguyen GC, Leung W, Weizman AV. Increased risk of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) infection among patients hospitalized for inflammatory bowel disease in the United States. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jun; 17 (6): 1338–42. DOI: 10.1002/ibd.21519.
16. Whang DW, Miller LG, Partain NM, McKinnell JA. Systematic review and meta-analysis of linezolid and daptomycin for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct; 57 (10): 5013–8. DOI: 10.1128/AAC.00714-13.
17. Weiner LM, Fridkin SK, Aponte-Torres Z, Avery L., Coffin N., Dudeck MA. et al. Vital Signs: Estimated Effects of a Coordinated Approach for Action to Reduce Antibiotic-Resistant Infections in Health Care Facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 65 (26): 565–7.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2017.
19. Cherazard R, Epstein M, Doan TL, Salim T, Bharti S, Smith MA. Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. *Am J Ther*. 2017 May; 24 (3): e361–9. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000551.
20. Lane N. Energetics and genetics across the prokaryote-eukaryote divide. *Biol Direct*. 2011; 6: 35. DOI: 10.1186/1745-6150-6-35.
21. Sojo V, Pomiankowski A, Lane N. A Bioenergetic Basis for Membrane Divergence in Archaea and Bacteria. *PLoS Biol*. 2014 Aug 12; 12 (8): e1001926. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001926.
22. Severin FF, Severina II, Antonenko YN, Rokitskaya TI, Cherepanov DA, Mokhova EN et al. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 12; 107 (2): 663–8. DOI: 10.1073/pnas.0910216107.
23. Kanazawa A, Ikeda T, Endo T. Synthesis and antimicrobial activity of dimethyl- and trimethyl-substituted phosphonium salts with

- alkyl chains of various lengths. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 May; 38 (5): 945–52.
24. Pernak J, Jedraszczak J, Krysiński J. [Quaternary ammonium- and phosphonium compounds against bacteria and fungi]. *Pharmazie.* 1987 Oct; 42 (10): 703–4. German.
25. Galkina I, Bakhtiyarova Y, Andriyashin V, Galkin V, Cherkasov R. Synthesis and Antimicrobial activities of phosphonium salts on basis of triphenylphosphine and 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl bromide. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and Related Elements.* 2013; 188: 15–8.
26. Listvan VN, Listvan VV, Malishevskaya AV, Deineka SY. [Benzyllic type triphenylphosphonium salts and their antimicrobial properties]. *Zhurnal organichnoy ta farmatsevtichnoy khimii.* 2008; 6 (24): 77–80. Ukrainian.
27. Martín-Rodríguez AJ, Babarro JM, Lahoz F, Sansón M, Martín VS, Norte M et al. From broad-spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyltriphenylphosphonium salts. *PLoS One.* 2015 Apr 21; 10 (4): e0123652. DOI: 10.1371/journal.pone.0123652.
28. Nikitina EV, Zeldi MI, Pugachev MV, Sapozhnikov SV, Shtyrlin NV, Kuznetsova SV, et al. Antibacterial effects of quaternary bis-phosphonium and ammonium salts of pyridoxine on *Staphylococcus aureus* cells: A single base hitting two distinct targets? *World J Microbiol Biotechnol.* 2016 Jan; 32 (1): 5. DOI: 10.1007/s11274-015-1969-0.
29. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16; 276 (7): 4588–96. DOI: 10.1074/jbc.M009093200.
30. Skulachev VP. A biochemical approach to the problem of aging: “megaproject” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects. *Biochemistry (Mosc).* 2007 Dec; 72 (12): 1385–96.
31. Khailova LS, Nazarov PA, Sumbatyan NV, Korshunova GA, Rokitskaya TI, Dedukhova VI et al. Uncoupling and toxic action of alkyltriphenylphosphonium cations on mitochondria and the bacterium *Bacillus subtilis* as a function of alkyl chain length. *Biochemistry (Mosc).* 2015 Dec; 80 (12): 1589–97. DOI: 10.1134/S000629791512007X.
32. Nazarov PA, Osterman IA, Tokarchuk AV, Karakozova MV, Korshunova GA, Lyamzaev KG et al. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci Rep.* 2017 May 3; 7 (1): 1394. DOI: 10.1038/s41598-017-00802-8.
33. Popova LB, Nosikova ES, Kotova EA, Tarasova EO, Nazarov PA, Khailova LS et al. Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2018 Jan 6; 1860 (5): 1000–7. DOI: 10.1016/j.bbame.2018.01.008.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАГОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА KPP10, ДЕЙСТВУЮЩЕГО НА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Н. П. Антонова^{1,2}, В. Ю. Балабаньян², А. П. Ткачук¹, В. В. Макаров³, В. А. Гушчин^{1,3,4} ✉

¹ Лаборатория трансляционной биомедицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

² Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

³ ФГБУ «ЦСП» Минздрава России, Москва

⁴ Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Одним из наиболее перспективных современных подходов для преодоления множественной лекарственной устойчивости можно назвать применение рекомбинантных эндолизин. Нами получены данные о физико-химических и литических свойствах бактериолизина фага KPP10 — рекомбинантного эндолизина, который эффективно действовал на штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в концентрации от 3 мкг/мл. Слитый в одной рамке трансляции с фрагментом положительно заряженного пептида SMAP-29, артилизин KPP10 действует на лабораторные штаммы и клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa* без использования пермеабилizаторов. Полученные результаты позволяют рассчитывать на успешное проведение доклинических испытаний эффективности артилизина AL-KPP10 с использованием инфекционных моделей.

Ключевые слова: внутрибольничные инфекции, антибиотикорезистентность, бактериофаги, эндолизины бактериофагов, фаг KPP10, артилизин AL-KPP10

Финансирование: статья подготовлена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Алексеевич Гушчин
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

Статья получена: 02.02.2018 **Статья принята к печати:** 23.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.010

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT KPP10 PHAGE LYSINS AND THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Antonova NP^{1,2}, Balabanyan VYu², Tkachuk AP¹, Makarov VV³, Gushchin VA^{1,3,4} ✉

¹ Laboratory for Translational Biomedicine,
N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow

² Faculty of Fundamental Medicine,
Lomonosov Moscow State University, Moscow

³ Center for Strategic Planning of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

⁴ Department of Virology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow

One of the most promising approaches to combatting multiple drug resistance is based on the use of recombinant endolysins. In this work we study physical, chemical and lytic properties of phage KPP10, a recombinant endolysin effective against *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations of 3 µg/ml. Fused with a fragment of positively charged SMAP-29 peptide into one reading frame, artilysin KPP10 is effective against laboratory strains and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of permeabilizers. Our findings encourage preclinical trials of this artilysin in infectious models.

Keywords: nosocomial infections, antimicrobial resistance, bacteriophages, lysins of bacteriophages, phage KPP10, artilysin KPP10

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation as part of the project RFMEFI60117X0018.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Gushchin
Gamaleya 18, Moscow, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

Received: 02.02.2018 **Accepted:** 23.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.010

Одной из современных проблем здравоохранения является стремительное увеличение количества штаммов бактерий, устойчивых к существующим антибактериальным средствам. Некоторые из них выработали резистентность даже к наиболее эффективным в настоящее время препаратам и препаратам резерва. Все больше штаммов приобретают множественную или широкую лекарственную устойчи-

вость. В отдельных случаях выявляются «супербактерии», не восприимчивые ни к одному применяемому для данной инфекции антибиотику. Быстрое появление и распространение разнообразных механизмов устойчивости к антибактериальным средствам обуславливает необходимость разработки принципиально новых подходов борьбы с бактериями. В краткосрочной перспективе существенным

представляется повышение эффективности использования известных антибиотиков, например, с помощью разработки усовершенствованных подходов к терапии. В долгосрочной перспективе необходима разработка антибактериальных средств, для которых развитие устойчивости будет маловероятным.

Одной из альтернатив антибиотикам и синтетическим антибактериальным средствам являются бактериофаги. Уже много лет они используются для борьбы с инфекциями, вызванными различными возбудителями [1, 2]. Применение бактериофагов имеет множество преимуществ: автоматическое дозирование в зависимости от степени заражения, минимальное нарушение естественной микрофлоры, низкая вероятность развития устойчивости, совместимость с антибиотиками, быстрая скорость разработки средств на основе фагов и их низкая стоимость, уничтожение биопленок, возможность единоразового введения и применения низких доз, а также низкая степень нагрузки на окружающую среду [3]. Однако есть и недостатки применения таких лекарственных препаратов. Работа с бактериофагами трудоемка — их сложно выделять из бактериальных культур с требуемой степенью чистоты, необходимо постоянно определять и нормировать их фармакокинетические характеристики, меняющиеся в процессе хранения. Между тем культивирование необходимо проводить на близких к патогену видах и штаммах, для которых отсутствуют эффективные стандартные протоколы культивирования и применяются высокие требования к безопасности в работе. К тому же, бактериофаги могут переносить гены бактериальных токсинов, а появление к ним устойчивости все же вероятно. И, наконец, фаги в высокой степени иммуногенны, что впоследствии снижает эффективность их повторного применения [3–5].

Новым классом антибактериальных агентов, которому не присущи вышеуказанные минусы, являются фаголизины (эндолизины). Фаголизины — это кодируемые бактериофагами специфические ферменты, расщепляющие пептидогликан клеточной стенки бактерий. В ходе своего жизненного цикла бактериофаги выделяют фаголизины для проникновения в клетку фаговой ДНК при инфицировании бактерий, а также для высвобождения новых вирионов из клетки. За счет действия своих каталитических доменов фаголизины способны расщеплению различных связей в пептидогликане. Гибель бактерии происходит вследствие гипотонического лизиса из-за различия в осмотическом давлении внутри и снаружи клетки [6].

Существует ряд неоспоримых преимуществ использования фаголизин по отношению к другим антимикробным агентам. Во-первых, это селективность. Воздействуя на определенный вид бактерий, фаголизины не влияют на представителей нормальной микрофлоры организма. Во-вторых, фаголизины очень быстро действуют на пептидогликан клеточной стенки, не задевая длительные метаболические процессы, что приводит к быстрому лизису бактерии. Время лечения таким препаратом может значительно снижаться по сравнению с терапией антибактериальными средствами. В-третьих, очень важным аспектом является низкая вероятность развития резистентности к фаголизинам. Фаголизины действуют на специфические молекулы-мишени, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток-хозяев, в связи с этим возникновение устойчивых изолятов маловероятно, поскольку должно сопровождаться коренной перестройкой бактериальной клеточной стенки. В-четвертых, фаголизины действуют на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий, что

решает одну из важнейших проблем здравоохранения. И, в-пятых, вследствие своей способности дестабилизировать пептидогликан клеточной стенки фаголизины способны не только уничтожать клетки бактерий, находящихся в различных метаболических состояниях (состоянии покоя или при активном делении), но и разрушать образующие патогенами биопленки [7].

Одним из опаснейших возбудителей внутрибольничных инфекций является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Борьба с ней сильно затруднена в связи с ее стремительно растущей устойчивостью к антибиотикам, способностью образовывать биопленки, а также разнообразием видов инфекций, вызываемых ею [8]. Создание новых лекарственных средств с активностью против *Pseudomonas aeruginosa* становится особенно важным.

Бактериофаг KPP10 обладает широким спектром действия на различные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* [9], в связи с чем его рекомбинантный фаголизин представляется перспективным белком для изучения физико-химических свойств и спектра литической активности, а также для создания на его основе антибактериального средства против *Pseudomonas aeruginosa*. В настоящей статье приводятся полученные нами данные по наработке рекомбинантного артилизина бактериофага KPP10, изучению его физико-химических свойств, а также бактерицидной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков AL-KPP10 и L-KPP10

Последовательности генов, кодирующих белки эндолизин L-KPP10 и артилизин AL-KPP10, были получены с использованием коммерческого синтеза (Евроген, Россия) в составе вектора pAL2-T. Последовательность была проверена на отсутствие ошибок с использованием секвенирования по Сэнгеру. В дальнейшем синтезированный ген в векторе pAL2-T, кодирующий последовательность L-KPP10, был расщеплен эндонуклеазами рестрикции по сайтам BamH – SacI и BamHI – PstI соответственно. По тем же сайтам был расщеплен экспрессионный вектор pQE-30. Полученные рестрикционные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле и после визуализации в УФ-свете выделяли необходимые фрагменты с помощью специального набора «Silica Bead DNA Extraction Kit» (Thermo, США). Далее проводили лигирование соответствующих рестрикционных фрагментов вставки и вектора в стандартном лигазном буфере T4 лигазой (Thermo, США).

Два полученных экспрессионных вектора pQE-30 (несущих гены AL-KPP10 и L-KPP10) помещали в компетентные клетки *Escherichia coli* штамма M15 с помощью трансформации методом «Heat Shock» для дальнейшей продукции белков. Для этого к компетентным клеткам добавляли полученные лигазные смеси, инкубировали в течение 25 мин на льду, затем нагревали при 42 °C в течение 45 с, помещали на лед на 2 мин, а затем добавляли среду LB, подрачивали клетки при 37 °C в течение 1 ч и высевали на чашки Петри. После инкубации чашек Петри при 37 °C в течение ночи, полученные колонии высевали в жидкую среду LB с необходимыми антибиотиками.

После наращивания клеток-продуцентов до $OD_{600} = 0,6$ и индукции в течение 3 ч с помощью добавления 1 mM IPTG проводили очистку на колонке с Ni-NTA – агарозой. Для этого индуцированные клетки лизировали буфером,

содержащим 6 М гидрохлорида гуанидина, 10 мМ Трис, 100 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pH 8,0) в течение 1 ч, а затем лизат, в котором находится целевой белок, наносили на колонку в режиме gravity flow. Белок элюировали с сорбента путем понижения pH в градиенте буферов (состоящем из 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 0,1 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, при pH от 8,0 до 5,5).

Далее полученные фракции белков AL-KPP10 и L-KPP10 очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP (GE Healthcare, Великобритания). Раствор белка наносили на колонку в буфере, состоящем из 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 0,1 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 мМ имидазола. Целевой белок элюировали с колонки с помощью буфера, содержащего 8 М мочевины, 10 мМ Трис, 100 мМ Na_2HPO_4 и 500 мМ имидазола (pH 5,5). Полученные фракции белков диализовали от буфера, в состав которого входят 5 мМ HEPES и 1 мМ DTT (pH 5,5) при 4 °С. Концентрацию белков измеряли спектрофотометрически на приборе HITACHI U-2900 (Hitachi, Япония) в кюветах с длиной пути 1 см. Измеряли оптическую плотность растворов белков при 280 нм. Концентрацию рассчитывали с учетом коэффициента поглощения $E_{280}^{0,1\%}$ нм, равного 1,455 и рассчитанного с помощью приложения ProtParam [10].

Физико-химические методы измерения

1. Измерение спектров кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма рекомбинантных белков, полученных в денатурирующих условиях и диализованных от 0,1 М фосфатного буфера, измеряли на модифицированном дихрографе Jobin-Ivon Mark V (Horiba, Япония) при комнатной температуре в кюветах с длиной оптического пути 1 мм, при концентрациях белков около 200 мкг/мл. Область измерения спектров составила 190–260 нм.

2. Динамическое лазерное светорассеяние

Гидродинамический диаметр частиц в растворе определяли на приборе ZetaSizer Nano-ZS компании Malvern Instruments LTD (Malvern, США) при 25 °С в специальных полистироловых кюветах с длиной пути 1 см. Длина волны лазера составляла 633 нм. Использовали пробы белков, полученных в денатурирующих условиях согласно методике, описанной выше с последующим диализом. Концентрация проб белков была заранее измерена на спектрофотометре. Полученные данные были обработаны с помощью программы Dispersion Technology Software version 5.10 (Malvern, США).

3. Измерение спектров флуоресценции

Спектры триптофановой флуоресценции проб белков с известной концентрацией (40 мкг/мл), полученных в денатурирующих условиях и очищенных на хроматографе, снимали на флуориметре FluoroMax-3 производителя HORIBA Jobin Yvon GmbH (Horiba, США) при комнатной температуре в специальных кюветах с длиной оптического пути 1 см, при возбуждающей эмиссии длине волны (соответствующей поглощению триптофана) равной 280 нм. Область измерения спектров составила 300–400 нм.

Изучение антибактериальных свойств

1. Изучение бактерицидной активности

Использовали препараты L-KPP10 и AL-KPP10, очищенные на хроматографической колонке и диализованные от буфера, содержащего 5 мМ HEPES и 1 мМ DTT (pH 5,5). Концентрацию белков доводили до необходимого значения тем же буфером.

Ночную культуру (2 мл в среде LB) бактериального штамма разбавляли и растили до оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,6$. Полученную культуру (2 мл) осаждали центрифугированием (3000 g, 10 мин), клетки ресуспендировали в таком же объеме 5 мМ HEPES (pH 5,5); мутность полученной суспензии должна соответствовать стандарту мутности по МакФарланду 0,5. Далее бактериальную культуру разбавляли в 100 раз таким же буфером (конечная плотность клеток составила 10^6 кл./мл). В 96-луночном планшете готовили следующие смеси:

1) 100 мкл суспензии бактерий, 50 мкл препарата в нужной концентрации и 50 мкл ЭДТА (конечная концентрация 0,5 мМ);

2) 100 мкл суспензии бактерий и 100 мкл препарата в нужной концентрации;

3) 100 мкл суспензии бактерий и 100 мкл буфера (контроль);

4) 100 мкл суспензии бактерий, 50 мкл буфера и 50 мкл ЭДТА (контроль).

Полученные смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем делали 10-кратные разведения в фосфатном буфере (pH 7,2) и 100 мкл каждого разведения наносили на чашки Петри с агаризованной средой LB. Колонии на чашках подсчитывали после ночной инкубации при 37 °С.

В микробиологических исследованиях были задействованы штамм *Pseudomonas aeruginosa* PA103, а также клинические изоляты Ts 38–16, Ts 43–16, Ts 44–16, Ts 47–16, Ts 48–16 и Ts 49–16, депонированные в коллекции Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Минздрава России.

2. Электронная микроскопия

AL-KPP10 в концентрации 50 мкг/мл добавляли к 10^6 КОЕ чувствительного штамма Ts 43-16 в буфере HEPES и инкубировали в течение 10, 20 или 30 мин при комнатной температуре.

10 мкл смеси наносили на специальную сеточку, высушивали при комнатной температуре, затем окрашивали 1% раствором уранилацетата, помещая сеточку на 30 с в каплю красителя. Остаток уранилацетата убирали, отмывая сеточку в капле воды в течение 30 с, промакивали фильтровальной бумагой и высушивали при комнатной температуре. Полученные препараты просматривали на электронном микроскопе JEOL JEM-101 (FEI Phenom World, Голландия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и характеристика физико-химических свойств рекомбинантных молекул эндолизина и артилизина

В ходе работы были получены два рекомбинантных белка: эндолизин L-KPP10 и его модифицированный вариант — артилизин AL-KPP10, содержащий на С-конце своей структуры фрагмент миелоидного антимикробного пептида SMAP-29 ([K2,7,13]-SMAP-29(1–17)). Конструкции были получены с использованием коммерческого синтеза генов. Для получения экспрессионных конструкций оба варианта гена были перенесены в вектор pQE-30. Два полученных экспрессионных вектора (несущих гены AL-KPP10 и L-KPP10) помещали в компетентные клетки штамма M15 *Escherichia coli* с помощью трансформации методом «Heat Shock», наращивали клетки-продуценты и индуцировали

продукцию белка с помощью добавления синтетического аналога лактозы ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозид). Далее клетки лизировали, полученные в денатурирующих условиях клеточные лизаты фракций белков AL-KPP10 и L-KPP10 очищали методом аффинной хроматографии с помощью гистидинового тага с N-концов белковых молекул и рефолдировали путем диализа.

На следующем этапе характеризовали различные физико-химические свойства полученных белков. Для определения структуры L-KPP10 и его модифицированного варианта AL-KPP10 проводили эксперименты в денатурирующих условиях и после ренатурации. В результате были исследованы: спектры кругового дихроизма для изучения вторичной структуры, спектры триптофановой флуоресценции для изучения наличия третичной структуры, а также динамическое лазерное светорассеяние белков для изучения их способности к агрегации/олигомеризации.

Изучение спектров кругового дихроизма показало, что AL-KPP10 и L-KPP10 имеют форму спектра, типичную для $\alpha\beta$ -белков с некоторым вкладом неупорядоченных структур (рис. 1А). Присутствие в структуре AL-KPP10 пептида [K2,7,13]-SMAP-29(1–17) не влияет на вторичную структуру белка, так как спектры практически полностью совпадают.

При помощи изучения спектров триптофановой флуоресценции исследовали наличие третичной структуры белков (рис. 1Б). По сравнению с денатурированными белками, у ренатурированных белков наблюдается смещение максимумов эмиссии в более коротковолновую область. Это смещение свидетельствует об уменьшении числа контактов триптофана в составе внутреннего белкового кора с молекулами растворителя вследствие восстановления

третичной структуры. Данный результат позволяет рассчитывать, что после ренатурации AL-KPP10 и L-KPP10 способны проявлять ферментативную активность.

Для изучения стабильности растворов полученных рекомбинантных белков был применен метод динамического лазерного светорассеяния. Данный метод позволяет определить гидродинамический размер белкового комплекса в растворе и способность молекулы белка к агрегации. Небольшие размеры наблюдаемого комплекса (3–7 нм) свидетельствуют о том, что белок находится в виде мономеров, а такое состояние является показателем стабильности белков в растворе. В случае изучаемых эндолизина динамическое лазерное светорассеяние показало, что большая часть белков в нативном состоянии находится в виде агрегатов размером около 60 нм, что является нормой для рекомбинантных белков, полученных с использованием процедуры ренатурации (рис. 1В, 1Г).

Противомикробная активность рекомбинантных молекул эндолизина и артилизина по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*

Для изучения противомикробной активности рекомбинантных эндолизина и артилизина KPP10 использовали коллекцию лабораторных штаммов и клинических изолятов лаборатории трансляционной биомедицины Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Минздрава России. Для изучения бактерицидного эффекта заданное количество предварительно подготовленных клеток нужных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* обрабатывали раствором с

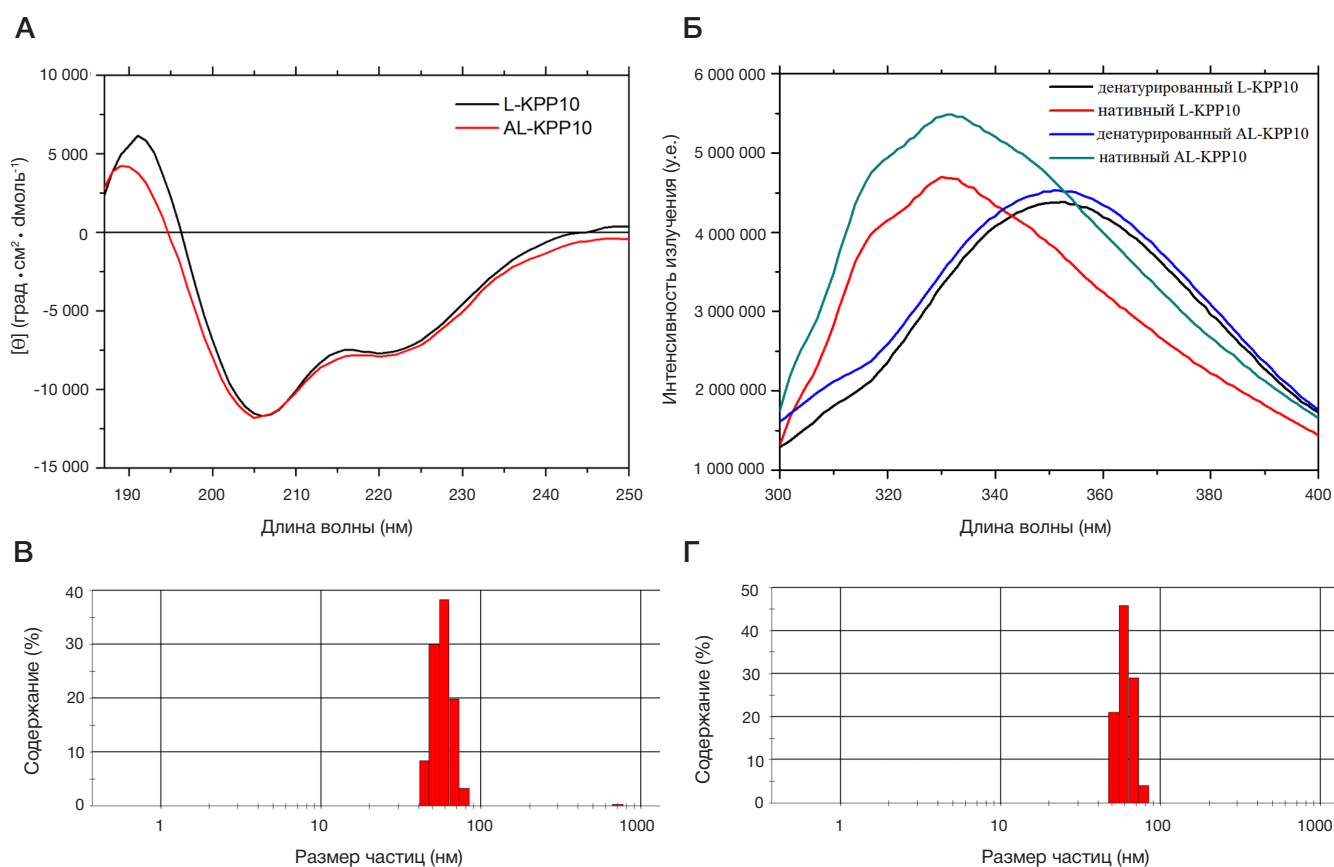


Рис. 1. Физико-химические свойства эндолизина L-KPP10 и артилизина AL-KPP10. Спектры кругового дихроизма белков AL-KPP10 и L-KPP10 (А). Спектры триптофановой флуоресценции белков в денатурирующих и нативных условиях (Б). Динамическое лазерное светорассеяние в растворах нативных белков AL-KPP10 (В) и L-KPP10 (Г)

различными концентрациями рекомбинантных фаголизина и артилизина, после чего производили посев на плотную агаризованную среду LB.

В результате экспериментов было показано, что эндолизин L-KPP10 не обладает бактерицидным эффектом на коллекционный штамм PA103 в исследованных концентрациях (рис. 2А). Данный результат был ожидаем, так как наличие наружной мембраны не позволяет белку проникнуть к молекулярным мишеням клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Так, совместная обработка бактериальных клеток белком L-KPP10 и ЭДТА в концентрации 0,5 мМ, повышающей проницаемость мембран, приводит к появлению литического эффекта в концентрациях уже от 3 мкг/мл (рис. 2Б).

Наличие положительно заряженного пептида в составе артилизина существенно изменяло наблюдаемую картину. Так, противомикробная активность артилизина AL-KPP10 проявлялась не только на штамме PA103, но и на четырех из шести клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 1 и рис. 3). Инкубация артилизина с клетками бактерий в количестве 10^6 в течение 30 мин приводила к снижению числа колониеобразующих единиц *Pseudomonas aeruginosa* на 10^5 кл. в концентрациях 25 и 50 мкг/мл (рис. 3А).

Для визуализации процесса лизиса клетки использовали электронную микроскопию. Для этого восприимчивый к действию артилизина клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa* Ts 43–16 обрабатывали AL-KPP10. Для обработки использовали концентрацию 50 мкг/мл. Инкубировали при комнатной температуре в течение 10, 20 и 30 мин. Визуализировали процесс лизиса под электронным микроско-

пом после окраски уранилацетатом (рис. 3Б). Как видно из рисунка, клетки *Pseudomonas aeruginosa* под действием белка теряют клеточную стенку, которую можно наблюдать в виде электронноплотной окрашенной массы, похожей на стружку.

Инкубация AL-KPP10 с чувствительными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* значительно снижает количество бактерий, выросших на чашках Петри, что показано на примере клинического изолята Ts 49–16 (рис. 3В).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время идет активный поиск различных фаголизinov для борьбы как с грамположительными, так и с грамотрицательными бактериями. Однако использование фаголизinov против грамотрицательных возбудителей затруднено из-за наличия наружной мембраны, препятствующей действию фермента на пептидогликан, поэтому необходимы вещества, увеличивающие проницаемость наружной мембраны. В качестве таковых могут использоваться полимиксины и их производные, аминогликозиды, ЭДТА, лимонная кислота и т. д. [11]. Например, были опубликованы результаты по эндолизу KZ144, полученному из антисинегного бактериофага phiKZ. Эндолизин KZ144 проявлял свои антимикробные свойства в присутствии пермеабилizаторов [12]. Еще одним примером служит запатентованный эндолизин OBPgpLYS. Данный белок обладает широким спектром действия на грамотрицательные бактерии и способен снижать количество бактерий на один порядок. При этом было показано, что добавление ЭДТА в небольших концентрациях увеличивает антимикробный

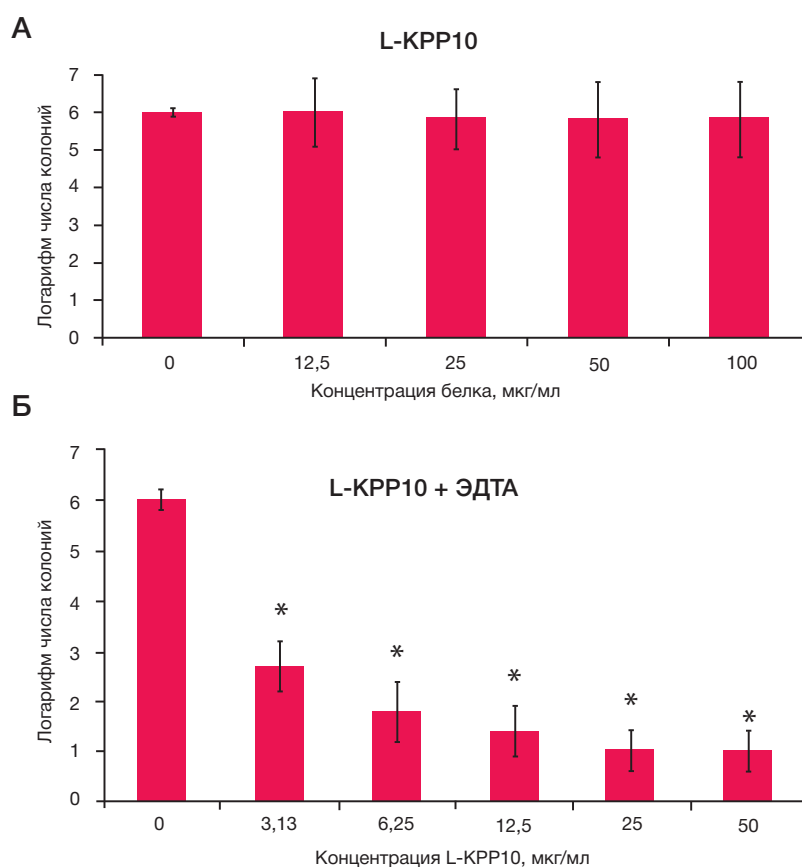


Рис. 2. Противомикробная активность рекомбинантного эндолизина по отношению к штамму PA103 *Pseudomonas aeruginosa*. Обработка различными концентрациями рекомбинантного L-KPP10 в отсутствии пермеабилizирующих агентов (А). Добавление 0,5 мМ ЭДТА к смеси бактерий и L-KPP10 (Б).

* — уровень значимости $p = 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Таблица 1. Противомикробная активность артилизина AL-KPP10 по отношению к клиническим изолятам *Pseudomonas aeruginosa*

Штамм/клинический изолят <i>P. aeruginosa</i>	Наличие эффекта
PA103	+
Ts 38-16	–
Ts 43-16	+
Ts 44-16	+
Ts 47-16	–
Ts 48-16	+
Ts 49-16	+

эффект против *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью на 10^2 – 10^3 [13].

Для того чтобы не задействовать дополнительные реагенты, увеличивающие проницаемость наружных мембран, был создан новый класс фаголизин — артилизин [14, 15, 16]. Эти соединения представляют собой слитые в одной рамке трансляции эндолизин и положительно заряженный пептид, который позволяет перенести молекулу через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Один из перспективных пептидов для этих целей —

миелоидный антимикробный пептид овцы SMAP-29. Эта амфифильная молекула связывается с отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны и образует в ней поры за счет встраивания своей гидрофобной части [17]. Примером артилизина, в состав которого входит молекула SMAP-29, служит артилизин Art-175 — модифицированный эндолизин бактериофага KZ144. В отличие от KZ144 артилизин Art-175 может проходить через наружную мембрану *Pseudomonas aeruginosa* и уничтожать бактерии, в том числе с множественной резистентностью, уменьшая их количество более чем на 10^4 [16]. При этом было выявлено, что активность фаголизин может быть шире, чем внутривидовая [18]. Так, для Art-175 была показана эффективность артилизина против бактерий *Acinetobacter baumannii*, в том числе штаммов, обладающих лекарственной устойчивостью, а также персистирующих форм [19].

Однако SMAP-29 в неизменном виде проявляет цитотоксичность по отношению к эритроцитам человека. В одном из исследований выявляли зависимость антибактериальной и гемолитической активности от длины пептида SMAP-29 и его первичной последовательности. После удаления и замены нескольких аминокислот была выявлена

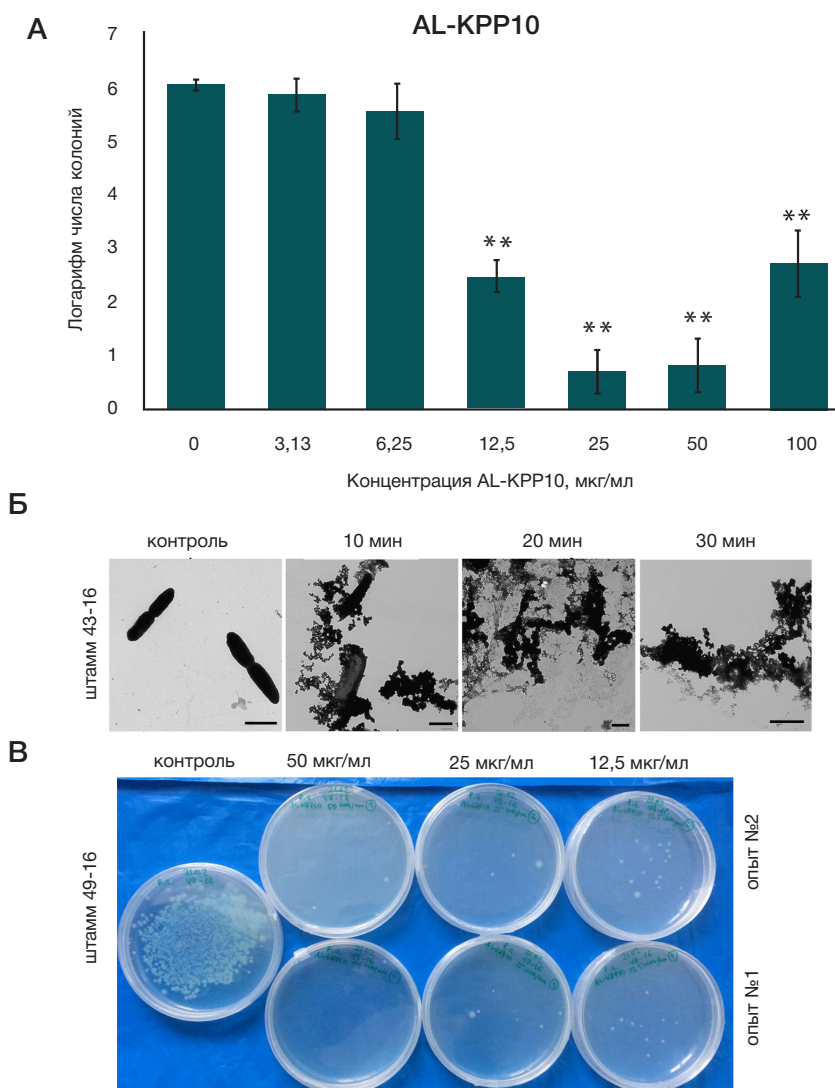


Рис. 3. Противомикробная активность рекомбинантного артилизина AL-KPP10 по отношению к восприимчивым штаммам *Pseudomonas aeruginosa*. Обработка различными концентрациями рекомбинантного AL-KPP10 в отсутствие пермеабилизирующих агентов различных чувствительных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (А), $p < 0,01$ (критерий Манна–Уитни). Электронная микроскопия клеток клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* Ts 43-16 после обработки AL-KPP10 в концентрации 50 мкг/мл в течение 10 мин, 20 мин и 30 мин (Б). Чашки Петри с нанесенной смесью артилизина и клеток клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* Ts 49-16 после инкубации в течение 30 мин (В)

структура [K2,7,13]-SMAP-29(1–17), обладающая оптимальной активностью и не проявляющая нежелательной цитотоксичности [20, 21].

В ходе настоящей работы было получено два рекомбинантных фаголизина — эндолизин L-KPP10 и его модифицированная форма — артилизин AL-KPP10. Изучение физико-химических свойств эндолизина и артилизина показало наличие у них третичной структуры, которая восстанавливается в процессе ренатурации, что позволяет предположить наличие у них ферментативной активности. Оба белка имеют профиль, позволяющий поддерживать высокую стабильность в растворе. Важно отметить, что присутствие положительно заряженного пептида SMAP-29(1–17) в составе фаголизина KPP10 не меняет структуры и свойств белка (см. рис. 1). Данные результаты позволили перейти к проверке противомикробной активности полученных рекомбинантных молекул.

В ходе работы по проверке бактериолизической активности было показано, что эндолизин L-KPP10 в исследованных концентрациях проявляет активность только в присутствии ЭДТА. ЭДТА как пермеабилизирующий агент способствовал проникновению эндолизина через наружную мембрану к клеточной стенке. Между тем, артилизин AL-KPP10 благодаря наличию в его структуре фрагмента антимикробного миелоидного пептида SMAP-29 ([K2,7,13]-SMAP-29(1–17)) не требует дополнительной пермеабилизации с помощью ЭДТА и оказывает бактерицидный эффект на широкий спектр штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Так, пять из семи исследованных клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* оказались восприимчивыми, а наибольшая активность проявлялась при концентрации белка 25 и 50 мкг/мл. Артилизин в данных концентрациях снижал количество бактерий на 10^5 в течение 30 мин.

Наиболее близким функциональным аналогом описанного в данной статье артилизина AL-KPP10 является артилизин Art-175, представляющий собой эндолизин KZ144, связанный с пептидом SMAP-29 в неизменном виде. Как и в случае с AL-KPP10, артилизин Art-175 может проходить через наружную мембрану *Pseudomonas aeruginosa* и лизировать бактерии. Отличие AL-KPP10 от артилизина Art-175 заключается не только в использовании оригинальной последовательности лизина KPP10, но и наличие модификации укороченного пептида SMAP-29, несущего три аминокислотные замены [позиции K2,7,13], что приводит к снижению цитотоксической активности [20, 21]. Также можно рассчитывать, что активность артилизина AL-KPP10 выше, чем у Art-175, так как, согласно приведенным в настоящей статье данным, AL-KPP10 проявляет активность на порядок выше чем Art-175 [16].

ВЫВОДЫ

Представленные в настоящей статье данные подтверждают работоспособность схемы, при которой возможно достижение литических свойств фаголизина, действующего на грамотрицательные бактерии не только изнутри клетки, но и снаружи с применением пермеабилизирующих агентов или положительно заряженных пептидов. Это согласуется с ранее опубликованными результатами по эндолину KZ144 полученному из антисинегнойного бактериофага phiKZ, а также по эндолину OBPgpLYS, которые проявляли свои антимикробные свойства в присутствии пермеабиллизаторов. Таким образом, в будущем можно рассчитывать на получение положительных результатов разработки на основе рекомбинантных фаголизина препаратов, которые станут реальной альтернативой антибиотикам.

Литература

1. Алешкин А. В., Светоч Э. А., Воложанцев Н. В., Киселева И. А., Рубальский Е. О., Ершова О. Н. и др. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. Бактериология. 2016; 1 (1): 22–31.
2. Aleshkin A, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubalsky E, Kiseleva I, et al. Phage-based cocktail for control of hospital-acquired pathogens. Phages 2015 Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology: Conference handbook; 2015 September 01–02; St Hilda's College, Oxford, UK; 2015. p. 17.
3. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. Bacteriophage. 2011; 1: 111–114.
4. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skropek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. Current Protein & Peptide Science. 2012; 13: 699–722.
5. Nilsson AS. Phage therapy-constraints and possibilities. Upsala Journal of Medical Sciences. 2014; 119: 192–8.
6. Rodríguez-Rubio L, Gutiérrez D, Donovan DM, Martínez B, Rodríguez A, García P. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. Critical Reviews in Biotechnology. 2016; 36 (3): 542–52.
7. Fischetti VA. Lysin Therapy for Staphylococcus aureus and Other Bacterial Pathogens. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2017; 409: 529–40.
8. Dwivedi GR, Tyagi R, Sanchita, Tripathi S, Pati S, Srivastava SK, et al. Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2017: 1–15.
9. Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, et al. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. Archives of Virology. 2012; 157 (4): 733–8.
10. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed). The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press. 2005; 571–607.
11. Briers Y, Walmagh M, Lavigne R. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Microbiology. 2011; 110 (3): 778–85.
12. Briers Y, Volckaert G, Cornelissen A, Lagaert S, Michiels CW, Hertveldt K, et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. Molecular Microbiology. 2007; 65 (5): 1334–44.
13. Briers Y, Lavigne R, Walmagh M, Miller S, inventors; Lysando AG, Katholieke Universiteit Leuven, K.U. Leuven R&D, assignee. Endolysin OBPgpLYS. United States patent US 8846865 B2. 2014 Sep 30.
14. Gerstman H, Rodríguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. Biochemical Society Transactions. 2016; 44 (1): 123–8.
15. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, et al. Engineered endolysin-based "Artilysin" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. MBio. 2014; 5 (4): e01379–14.
16. Briers Y, Walmagh M, Grymonprez B, Biebl M, Pirnay JP, Defraigne V, et al. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014; 58 (7): 3774–84.
17. Dawson RM, Liu CQ. Cathelicidin peptide SMAP-29:

comprehensive review of its properties and potential as a novel class of antibiotics. *Drug Development Research*. 2009; 70 (7): 481–98.

18. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010; 300 (6): 357–62.
19. Defraigne V, Schuermans J, Grymonprez B, Govers SK, Aertsen A, Fauvart M, et al. Efficacy of Artilysin Art-175 against Resistant and Persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy. 2016; 60 (6): 3480–8.

20. Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, Zanetti M, Gennaro R. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Letters*. 1999; 463 (1–2): 58–62.
21. Shin SY, Park EJ, Yang ST, Jung HJ, Eom SH, Song WK, et al. Structure–activity analysis of SMAP-29, a sheep leukocytes-derived antimicrobial peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 285 (4): 1046–51.

References

1. Aleshkin AV, Svetoch EA, Volozantsev NV, Kiseleva IA, Rubalsky EO, Ershova ON, et al. Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation. *Bacteriology*. 2016; 1: 22–31.
2. Aleshkin A, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubalsky E, Kiseleva I, et al. Phage-based cocktail for control of hospital-acquired pathogens. *Phages 2015 Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology: Conference handbook*; 2015 September 01-02; St Hilda's College, Oxford, UK; 2015. p. 17.
3. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011; 1: 111–114.
4. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *Current Protein & Peptide Science*. 2012; 13: 699–722.
5. Nilsson AS. Phage therapy-constraints and possibilities. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2014; 119: 192–198.
6. Rodríguez-Rubio L, Gutiérrez D, Donovan DM, Martínez B, Rodríguez A, García P. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016; 36 (3): 542–52.
7. Fischetti VA. Lysin Therapy for *Staphylococcus aureus* and Other Bacterial Pathogens. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2017; 409: 529–40.
8. Dwivedi GR, Tyagi R, Sanchita, Tripathi S, Pati S, Srivastava SK, et al. Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2017; 1–15.
9. Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, et al. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. *Archives of Virology*. 2012; 157 (4): 733–8.
10. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. 2005; 571–607.
11. Briers Y, Walmagh M, Lavigne R. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 2011; 110 (3): 778–85.
12. Briers Y, Volckaert G, Cornelissen A, Lagaert S, Michiels CW, Hertveldt K, et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Molecular Microbiology*. 2007; 65 (5): 1334–44.
13. Briers Y, Lavigne R, Walmagh M, Miller S, inventors; Lysando AG, Katholieke Universiteit Leuven, K.U. Leuven R&D, assignee. Endolysin OBPgplYS. United States patent US 8846865 B2. 2014 Sep 30.
14. Gerstmans H, Rodríguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44 (1): 123–8.
15. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, et al. Engineered endolysin-based "Artilysin" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio*. 2014; 5 (4): e01379–14.
16. Briers Y, Walmagh M, Grymonprez B, Biebl M, Pirnay JP, Defraigne V, et al. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persisters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58 (7): 3774–84.
17. Dawson RM, Liu CQ. Cathelicidin peptide SMAP-29: comprehensive review of its properties and potential as a novel class of antibiotics. *Drug Development Research*. 2009; 70 (7): 481–98.
18. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010; 300 (6): 357–62.
19. Defraigne V, Schuermans J, Grymonprez B, Govers SK, Aertsen A, Fauvart M, et al. Efficacy of Artilysin Art-175 against Resistant and Persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016; 60 (6): 3480–8.
20. Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, Zanetti M, Gennaro R. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Letters*. 1999; 463 (1–2): 58–62.
21. Shin SY, Park EJ, Yang ST, Jung HJ, Eom SH, Song WK, et al. Structure–activity analysis of SMAP-29, a sheep leukocytes-derived antimicrobial peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 285 (4): 1046–51.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ МЦ540 К МОДЕЛИ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

Т. А. Шмиголь¹✉, К. А. Собянин², М. В. Прусак-Глотов¹, С. П. Щелыкалина³, Е. В. Невежин³, С. А. Ермолаева⁴, В. В. Негребецкий¹

¹ Отдел медицинской химии и токсикологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Лаборатория биологических испытаний, Институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³ Кафедра медицинской кибернетики и информатики, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

⁴ Лаборатория экологии возбудителей инфекций, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является альтернативным методом лечения инфекций, позволяющим убивать лекарственно-устойчивые бактерии без повреждения ткани хозяина. В настоящем исследовании использован полирезистентный клинический штамм *Pseudomonas aeruginosa* PA21 (*P. aeruginosa*) в модели раневой инфекции на мышах для изучения влияния ФДТ (в водных растворах анионного фотосенсибилизатора Мероцианина 540 (МЦ540): в воде и 0,25 М NaCl) на бактериальную инактивацию и заживление ран. После проведения ФДТ гибель бактерий оценивали путем определения бактериологической нагрузки в ранах, процесс заживления ран контролировали прямым измерением штангенциркулем в двух проекциях, а также проведением патоморфологических исследований послойных срезов инфицированных ран. Полученные результаты показали, что ФДТ в присутствии МЦ540 в растворе хлорида натрия (но не МЦ540 в воде) способна вызывать гибель бактерии, препятствовать их восстановлению и значительно ускорять процесс заживления ран.

Ключевые слова: антимикробная фотодинамическая терапия, полирезистентный клинический штамм *Pseudomonas aeruginosa*, инфекция кожи и мягких тканей, заживление ран, мероцианин 540, раневая инфекция

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-33-00970 мол_а.

✉ Для корреспонденции: Татьяна Анатольевна Шмиголь
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; tatishtish@gmail.com

Статья получена: 20.01.2018 Статья принята к печати: 23.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.011

THE USE OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY MC540 IN THE INFECTED WOUND MODEL

Shmigol TA¹✉, Sobianin KA², Prusak-Glotov MV¹, Shchelykalina SP³, Nevezhin EV³, Yermolaeva SA⁴, Negrebetsky VadV¹

¹ Department of Medicinal Chemistry and Toxicology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Laboratory of Biological Research. Institute for Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

³ Department of Medical Cybernetics and Informatics, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

⁴ Laboratory for the Ecology of Pathogens, Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative to conventional therapies of infections. It can kill drug-resistant bacteria without damaging host tissues. In the present work we use the multiresistant strain PA21 of *Pseudomonas aeruginosa* to model a wound infection in mice and study the effect of PDT mediated by aqueous solutions of the anionic photosensitizer merocyanine 540 (solubilized in water and in 0.25 M sodium chloride) on bacterial decontamination and wound healing. To assess a therapeutic effect of PDT, we monitored bacterial contamination of the wound, measured the wound size in two planes using a caliper and carried out a histopathological examination of infected tissue sections. Our study reveals that PDT mediated by MC540 in the sodium chloride solution can induce bacterial death, inhibit bacterial re-growth and accelerate wound healing.

Keywords: antimicrobial photodynamic therapy, multiresistant clinical strain, *Pseudomonas aeruginosa*, skin infection, soft tissue infection, wound healing, merocyanine 540, wound infection

Funding: this study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project ID 16-33-00970 mol_a).

✉ Correspondence should be addressed: Tatiana Shmigol
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; tatishtish@gmail.com

Received: 20.01.2018 Accepted: 23.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.011

Кожа служит физическим барьером и первой линией защиты организма от окружающих патогенов. При повреждении кожного покрова в ране может развиваться инфекция и остановить процесс заживления раны, приведя к увеличению риска заболеваемости и даже смертности. Открытие антибиотиков произвело революцию в лечении инфекций, но наблюдающееся в последнее время увеличение резистент-

ности к антибиотикам среди патогенных бактерий диктует необходимость поиска новых альтернативных методов лечения локализованных инфекций. Одним из таких методов стала ФДТ, которая ранее успешно применялась в лечении онкологии [1–3], а недавно была предложена для лечения бактериальных инфекций [4–7]. Суть антимикробной ФДТ заключается в местном применении в

инфицированной ткани нетоксичного красителя — фотосенсибилизатора (ФС) с последующим воздействием монохроматическим светом с длиной волны, к которой чувствителен ФС [8–9]. Под действием света ФС активируется, генерируя свободные радикалы и/или синглетный кислород, губительные для инфекционных агентов.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния ФДТ с использованием анионного ФС МЦ540 в модели раневой инфекции на животных на бактериальную инактивацию и на процесс заживления ран. Мыши линии BALB/c были инфицированы полирезистентным клиническим штаммом *Pseudomonas aeruginosa* PA21. Инактивацию бактерий оценивали путем определения бактериологической нагрузки в ранах, процесс заживления ран контролировали прямым измерением штангенциркулем в двух проекциях, а также проведением патоморфологических исследований послойных срезов инфицированных ран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фотосенсибилизатор

Маточный раствор МЦ540 (Sigma-Aldrich, Швейцария) в концентрации 1×10^{-3} М готовили в 96% этаноле в день проведения опыта. Концентрацию МЦ540 определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon_{500} = 63\,000\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ в воде. В рабочих растворах концентрация МЦ540 составляла 25 мкМ, которую получали путем разведения маточного раствора МЦ540 (1×10^{-3} М) водой или 0,25 М раствором NaCl (ACROS, США).

Культуры клеток микроорганизмов

В работе использовали полирезистентный клинический штамм *Pseudomonas aeruginosa* PA21 из коллекции микроорганизмов ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи.

P. aeruginosa инкубировали в течение ночи при 37 °С в питательном бульоне Brain Heart Infusion (BHI «Difco», США), разводили в свежей питательной среде 1:100, растили до оптической плотности (OD_{600}), равной 1, что соответствует концентрации 10^9 КОЕ/мл. Далее культуру дважды отмыли фосфатно-солевым буфером (рН = 7,4) (Экосервис, Россия) и аликвотами по 50 мкл наносили на рану.

Бактериальная нагрузка ран

Отбор материала производили по следующей методике: при помощи ватных тампонов получали мазок непосредственно с поверхности раны. Далее тампон помещали в пробирку с 0,9 мл физиологического раствора, из которого в последующем готовили серийные разведения 1:10, 1:100, 1:1000. Каждое разведение высевали на две чашки с агаризованной средой (BHI «Difco», США), подсчет колоний проводили через 24 ч, результаты выражали в колоние-

образующих единицах (КОЕ), а именно в десятичном логарифме, взятом от количества КОЕ.

Антимикробная фотодинамическая терапия

Манипуляции во время проведения экспериментов выполняли с соблюдением правил асептики и антисептики с использованием щадящей методики обезболивания. Все исследования проводили с соблюдением правил биоэтики и международных принципов и требований «Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, март 1986 г.) и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

В исследовании использовали мышей BALB/c 6–8 недель и весом 17–21 г. За сутки до проведения ФДТ на спине животных выбривали участок кожи площадью 2 см² и затем перманентным маркером намечали контур будущей раны. Перед формированием раны животным давали ингаляционный наркоз (изофлуран). Поверхность кожи дважды обрабатывали антисептиком, наносили рану округлой формы 1,5 см в диаметре, иссекали кожу, подкожную клетчатку и фасцию до мышц. Далее на рану наносили аликвоту объемом 50 мкл, содержащую суспензию бактерий (*P. aeruginosa*) в концентрации 10^7 КОЕ/мл. Через 6 ч после инокуляции бактерий проводили ФДТ.

Животных разделили на 4 группы (табл. 1). Мыши из группы А ($n = 18$) служили в качестве абсолютного контроля, не получая никакого лечения; мыши из группы Б ($n = 18$) служили в качестве светового контроля и для лечения инфицированной раны облучались монохроматическим светом с длиной волны 530 нм и временем экспозиции 5 мин; мыши группы В ($n = 18$) получали ФДТ в присутствии 25 мкМ водного раствора МЦ540 с облучением монохроматическим светом с длиной волны 530 нм и временем экспозиции 5 мин; мыши группы Г ($n = 18$) получали ФДТ в 25 мкМ водном растворе МЦ540 в присутствии 0,25 М NaCl с облучением монохроматическим светом с длиной волны 530 нм и временем экспозиции 5 мин. Из каждой группы было оставлено по 3 животных для наблюдения за долгосрочными эффектами (36 сут.).

Мышей обрабатывали локально 50 мкл раствора 25 мкМ в 0,25 М NaCl, с экспозицией без облучения в течение 5 мин. Обработанные очаги были освещены светом с длиной волны 530 нм, обеспечивающим 2 мВт/см² в течение 5 мин, что соответствует общей дозе 6 Дж/см².

Гистология

Биологический материал фиксировали в буферном растворе 10%-го формалина. Фиксированные образцы заключали в парафин. Срезы толщиной 3–7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и использовали для микроструктурного анализа и морфометрических наблюдаемых процессов. Морфометрические данные были получены с помощью микроскопа-анализатора AxioimagerA-2 (Carl Zeiss, Германия).

Таблица 1. План исследования на животных

Группа	Количество животных	Бактерии	Лечение
Группа А: абсолютный контроль	18	<i>P. aeruginosa</i>	Без лечения
Группа Б: световой контроль	18	<i>P. aeruginosa</i>	Свет (6 Дж/см ² ; $\lambda = 530$ нм)
Группа В: ФДТ + МЦ540	18	<i>P. aeruginosa</i>	МЦ540 + Свет (6 Дж/см ² ; $\lambda = 530$ нм)
Группа Г: ФДТ + МЦ540 + 0,25 М NaCl	18	<i>P. aeruginosa</i>	МЦ540 + 0,25 М NaCl + Свет (6 Дж/см ² ; $\lambda = 530$ нм)

Заживление раневого дефекта

При наблюдении за состоянием раневых дефектов оценивали наличие признаков воспаления, характер и количество раневого отделяемого и т. д. Измерение ран с помощью линейки и штангенциркуля в двух проекциях осуществляли за 1 ч до проведения ФДТ на 2-е, 4-е, 7-е и 14-е сут. Для выявления характера течения репаративных процессов в исследуемых группах животных вычисляли следующие показатели динамики заживления экспериментальных ран:

1. Показатель изменения площади раневой поверхности в динамике (ΔS , %):

$$\frac{(S_0 - S_n) \times 100}{S_0},$$

где S_0 — исходная площадь раны, S_n — площадь раны на n -е сутки.

2. Относительная скорость уменьшения площади раневого дефекта ($v_{\text{зак.}}^*$ %/сутки):

$$\frac{(S_0 - S_n) \times 100\%}{S_0 \times n},$$

где S_0 — исходная площадь раны, S_n — площадь раны на n -е сутки, n — порядковый номер суток эксперимента.

3. Показатель скорости эпителизации раны ($v_{\text{эпит.}}^*$ мм²/сутки):

$$\frac{S_0 - S_n}{T},$$

где S_0 — исходная площадь раны, S_n — площадь раны на n -е сутки, T — число суток между измерениями.

Все цифровые данные обрабатывали с использованием компьютерной программы Universlab DeskTer River V3.3.3269

Статистика

Рассчитывали средние значения определяемых величин и стандартную ошибку среднего: $SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$, где s — выборочное среднее квадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На следующие сутки после моделирования ран и проведения ФДТ общее состояние животных можно было оценить как удовлетворительное. Животные были активны, слизистые оболочки без видимых изменений, шерстный покров гладкий. Раны у всех животных имели признаки развивающегося нагноения. Наиболее выраженное нагноение наблюдалось в контрольных группах.

Бактериальная нагрузка

Одним из значимых критериев оценки эффективности проведенного лечения гнойных ран мягких тканей является микробиологическое исследование. Определение бактериальной нагрузки производилось до начала проведения лечения, через 48, 96 и 168 ч после ФДТ. Количественные показатели бактериальной нагрузки ран представлены в табл. 2.

Через 6 ч после инфицирования перед ФДТ исходная контаминация ран во всех группах животных была одинаковой и составила $5,03 \pm 0,04 \times 10^6$ КОЕ/мл.

В опытных группах В (ФДТ индуцированная МЦ540 в воде) и Г (ФДТ индуцированная МЦ540 в растворе натрия хлорида) через 48 ч после проведения ФДТ количество *P. aeruginosa* уменьшилось на 10^2 и 10^3 КОЕ/мл соответственно.

Таблица 2. Изменение бактериальной нагрузки ран, КОЕ/мл

Группа	Время после проведения ФДТ			
	0 ч	48 ч	96 ч	168 ч
Группа А	$5,00 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$
Группа Б	$4,95 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$
Группа В	$5,01 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$0,7 \times 10^2$	Не высевалось
Группа Г	$5,15 \times 10^6$	$1,5 \times 10^3$	Не высевалось	Не высевалось

Таблица 3. Морфометрический анализ состояния ремоделирования внутрираневого матрикса у мышей линии BALB/c

Показатель изменения площади раневой поверхности в динамике, ΔS				
Группа	Время после проведения ФДТ, сут.			
	2-е сут.	4-е сут.	7-е сут.	14-е сут.
Группа А	$11,11 \pm 0,37$	$25,00 \pm 0,82$	$41,11 \pm 1,36$	$84,43 \pm 3,78$
Группа Б	$13,55 \pm 0,45$	$32,22 \pm 1,39$	$50,01 \pm 1,65$	$85,30 \pm 3,75$
Группа В	$16,66 \pm 0,53$	$40,02 \pm 2,17$	$48,33 \pm 1,76$	$93,31 \pm 1,89$
Группа Г	$30,01 \pm 2,33$	$55,55 \pm 3,61$	$67,77 \pm 4,75$	$94,77 \pm 4,17$
Относительная скорость уменьшения дефекта, $v_{\text{зак.}}^*$				
Группа	Время после проведения ФДТ, сут.			
	2-е сут.	4-е сут.	7-е сут.	14-е сут.
Группа А	$5,55 \pm 0,18$	$6,25 \pm 0,21$	$5,87 \pm 0,19$	$6,03 \pm 0,12$
Группа Б	$7,50 \pm 0,25$	$10,51 \pm 0,35$	$7,14 \pm 0,24$	$5,95 \pm 0,13$
Группа В	$8,33 \pm 0,29$	$10,00 \pm 0,87$	$6,90 \pm 0,77$	$5,92 \pm 0,28$
Группа Г	$15,01 \pm 0,16$	$13,88 \pm 1,91$	$9,68 \pm 1,01$	$7,33 \pm 0,45$

Сравнительная характеристика течения инфицированных раневых дефектов

Сравнительный анализ результатов наблюдения характеристик течения раневых дефектов в экспериментальных группах позволил установить межгрупповые различия динамики заживления раневых дефектов по показателю ΔS (табл. 3).

Анализ полученных данных показал, что значения ΔS контрольных групп А и Б достоверно меньше ($p < 0,05$) соответствующих показателей опытных групп В и Г на всех этапах проведения эксперимента (исключение составило отсутствие значимых различий с результатом группы Б и В на 7-е сут.).

Сравнительный анализ скоростей заживления раневых дефектов в динамике выявил значимые внутригрупповые различия показателей $v_{\text{зж.}}$ (см. табл. 3). Из полученных данных видно, что наибольшая скорость заживления наблюдается в группе Г, а в остальных группах на протяжении 14 сут., показатели $v_{\text{зж.}}$ находились на достаточно стабильном уровне ($p > 0,05$). Отметим, что скорость заживления к 14 сут. снижается и становится практически одинаковой для всех групп.

Нами выявлены существенные изменения, а также межгрупповые различия показателей скорости эпителизации раневых дефектов ($v_{\text{эпит.}}$) в процессе проведения эксперимента (табл. 4).

Максимальные значения скорости эпителизации ($v_{\text{эпит.}}$) в интервале 4–7 сутки были отмечены в группе Г ($p < 0,05$ во всех случаях), к 14 сут. скорость эпителизации во всех группах снижалась.

В первые 48 ч в ране происходят изменения, характеризующиеся формированием кровяного сгустка. В основе сгустка лежит фибрин, который формирует струп с выпотом экссудата и клеточных элементов с преобладанием нейтрофилов. Наступает лизис форменных элементов крови с формированием всех признаков гнойного воспаления (рис. 1 А).

Под лизирующимся струпом бурно разрастается молодая соединительная ткань в основе которой выявляются многочисленные тонкостенные капилляры, синусы, лакуны, заполненные большим количеством крови (рис. 1 Б). Со временем (4–7 сут.) вновь образованная соединительная ткань превращается в рубцовую, порой гиалинизированную и даже петрифицированную (рис. 1 Е). Даже неглубоко расположенные такие инфильтраты вызывают контрактуры, и, следовательно, приводят к неподвижности кожи.

В это же время в гистологических препаратах выявлялось медленное (24–48 ч), а затем бурное размножение базальных клеток эпидермиса с нарастающей его кератинизацией. Разрастаясь и дифференцируясь, эпидермис постепенно закрывает дефект кожи (табл. 4, рис. 1 Д). Синтетические процессы в ране проходят равнонаправленно, но с определенным сдвигом во времени. На эти

Таблица 4. Морфофункциональная динамика репаративного эпителиального покрова инфицированных ран мышей линии BALB/c

Скорость эпителизации раны, $v_{\text{эпит.}}$				
Группа	Время после проведения ФДТ, дни			
	2-е сут.	4-е сут.	7-е сут.	14-е сут.
Группа А	1,07 ± 0,04	5,17 ± 0,23	15,69 ± 1,18	6,33 ± 1,05
Группа Б	2,24 ± 0,07	6,19 ± 0,27	16,07 ± 0,82	6,41 ± 1,16
Группа В	2,63 ± 0,09	5,41 ± 0,24	14,31 ± 0,45	6,09 ± 1,24
Группа Г	3,52 ± 0,11	8,01 ± 0,35	16,94 ± 0,86	8,11 ± 1,53

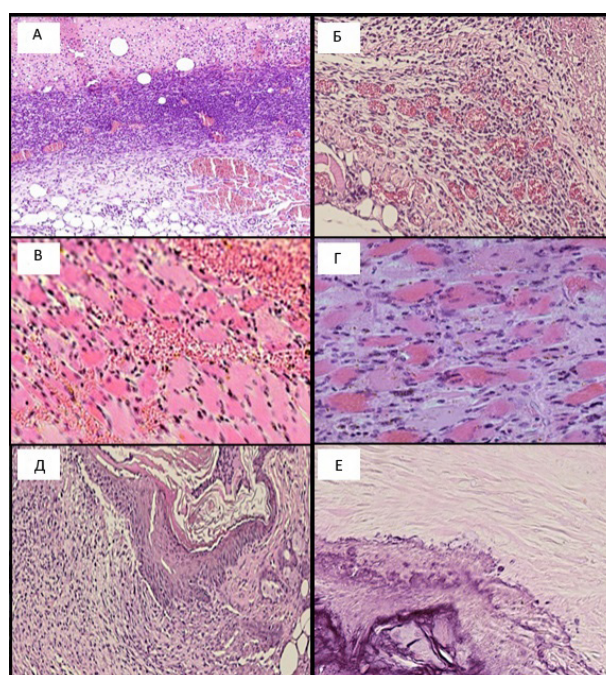


Рис 1. Микроструктура инфицированных ран кожи мышей после ФДТ. Окраска: гематоксилин-эозин. (А) Молодая грануляционная ткань раны на 4-е сут., $\times 150$. (Б) Гиперемия сосудов и отек тканей микрососудистого русла на 4-е сут., $\times 350$. (В) «Заболоченность» кровью мышечной ткани раны на 4-е сут., $\times 250$. (Г) Фрагменты мышечной ткани в состоянии внутриклеточной регенерации на 7-е сут., $\times 450$. (Д) Эпителизация и рубцевание ран на 14-е сут., $\times 150$. (Е) Гиалиноз и петрификация внутренней рубцовой ткани на 36-е сут., $\times 150$

процессы влияет много факторов, в том числе заданные экспериментом (табл. 3 и 4, рис. 1).

Обилие крови, усиленная оксигенация и обилие ферментативных процессов в ране, возникающие со временем, усиливают процесс неполной репаративной регенерации. Протекающий процесс вызывает даже внутриклеточную регенерацию миосателлитов (табл. 3 и 4, рис. 1 Г).

Таким образом, микроструктурный анализ хорошо коррелирует с полученными данными (табл. 2–4, рис. 1) и указывает на бурное заживление ран за счет активного роста, дифференцировки и созревания микрососудистого русла с формированием грануляционной ткани, а также усиленной эпителизации раневого дефекта.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях *in vitro* ранее нами было показано, что в случае ФДТ МЦ540 в присутствии 0,25 М NaCl инактивация *P. aeruginosa* возрастает в 10 раз по сравнению с ФДТ МЦ540 в воде [10]. Наблюдаемый эффект был объяснен разной степенью агрегации МЦ540 в воде и в присутствии соли. В воде МЦ540 находится как в мономерной, так и димерной формах [11], из которых только мономерная форма способна генерировать активные формы кислорода, в первую очередь — синглетный кислород [12, 13]. В солевых растворах МЦ540 образует крупные кристаллоподобные агрегаты, способные к генерации свободных радикалов [14–17].

Представленные в настоящем исследовании данные на животных моделях убедительно подтвердили ранее полученные данные *in vitro* по следующим показателям: гибель бактерий, препятствование их восстановлению и ускорение процесса заживления ран.

Действительно, согласно представленным в табл. 2 данным, после проведенной ФДТ с МЦ540 в растворе хлорида натрия полное очищение раны от полирезистентного штамма *P. aeruginosa* происходит к 4 сут., тогда как при проведении ФДТ с МЦ540 в воде аналогичные изменения наблюдались лишь на 7-е сут.

Морфометрические данные (табл. 3) подтверждают лучшую эффективность агрегатов МЦ540 по сравнению с его мономерами и димерами в отношении скорости за-

живления раневого дефекта и уменьшения его площади. Так, к 4 сут. площадь раневого дефекта у животных из группы Г уменьшилась на 45%, в то время как для группы В эта величина составляет 60%, что близко к показателям группы Б (68%).

Наблюдаемые изменения относительной скорости уменьшения дефекта (табл. 3) в случае группы А имеют практически линейную зависимость (с учетом среднеквадратичного отклонения), для групп Б–В — параболическую с максимумом на 4-е сут., а для группы Г — экспоненциальную. Для животных всех исследованных групп на 14-е сутки наблюдалось снижение скорости заживления. Полученные данные согласуются с описанным ранее изменением показателя площади раневой поверхности (табл. 3).

Регенерация эпителиального покрова ран происходит значительно быстрее, и становится ярко выраженной уже на 4-е сут. в группе Г (см. табл. 4), в отличие не только от контроля, но и группы, получившей лечение на основе ФДТ с МЦ540 в воде.

Микроструктурный анализ хорошо коррелирует с полученными данными (табл. 2–4, рис. 1) и указывает на бурное заживление ран за счет активного роста, дифференцировки и созревания микрососудистого русла с формированием грануляционной ткани, а также усиленной эпителизации раневого дефекта. Однако, хотя процессы заживления, а также очищения раны от патогенных бактерий происходили намного быстрее в случае применения ФДТ с МЦ540 в растворе хлорида натрия, сам процесс происходит «жестче» с расплавлением фибрина и образованием фибриноида. Для ФДТ с МЦ540 в воде процесс заживления проходит медленнее, «мягче» и без активного образования фибриноида.

ВЫВОДЫ

Согласно данным, полученным в модели раневой инфекции на мышах, ФДТ с МЦ540 в растворе хлорида натрия способна намного эффективнее вызывать гибель бактерий, препятствовать их последующему восстановлению и значительно ускорять процесс заживления ран, по сравнению с контрольными группами и ФДТ с МЦ540 в воде.

Литература

1. Fakayode OJ, Tsolekile N, Songca SP, Oluwafemi OS. Applications of functionalized nanomaterials in photodynamic therapy. *Biophys.* 2018; 2. doi: 10.1007/s12551-017-0383-2.
2. Rundle P. Photodynamic Therapy for Eye Cancer. *Biomedicines.* 2017; 5 (4): 69.
3. Meimandi M, Talebi Ardakani MR, Esmaili Nejad A, Yousefnejad P, Saebi K, Tayeedy MH. The Effect of Photodynamic Therapy in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Review of Literature. *J Lasers Med Sci.* 2017; 8 (1): 7–11.
4. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004; 17: 245–54.
5. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 436–50.
6. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 33: 67–73.
7. Neundorff I, Reinhardt A. Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (5): 701.
8. Joseph B, Janam P, Narayanan S, Anil S. Is Antimicrobial Photodynamic Therapy Effective as an Adjunct to Scaling and Root Planing in Patients with Chronic Periodontitis? A Systematic Review *Biomolecules.* 2017; 7 (4): 79.
9. Liu CC, Zhao JJ, Zhang R1, Li H, Chen B, Zhang LL et al. Multifunctionalization of graphene and graphene oxide for controlled release and targeted delivery of anticancer drugs. *Am J Transl Res.* 2017; 9 (12): 5197–219.
10. Шмиголь Т. А., Бехало В. А., Сысолятина Е. В., Нагурская Е. В., Ермолаева С. А., Потапенко А. Я. Влияние хлорида натрия на агрегацию мероцианина 540 и фотосенсибилизированную инактивацию *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. *Acta Naturae.* 2011: 112–118.
11. Bilski P, McDevitt T, Chignell CF. Merocyanine 540 solubilized as an ion pair with cationic surfactant in nonpolar solvents: spectral and photochemical properties. *Photochem Photobiol.* 1999; 69 (6): 671–676.
12. Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown GE Jr. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ Sci Technol.* 2012; 46 (13): 6900–14.
13. Kepczynski M, Dzieciuch M, Nowakowska M. Nano-structural

hybrid sensitizers for photodynamic therapy. *Curr Pharm Des.* 2012; 18 (18): 2607–21.

14. Ragàs X, Xin He, Agut M, Roxo-Rosa M, Rocha Gonsalves A, Arménio C. Serra et al. Singlet Oxygen in Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photosensitizer-Dependent Production and Decay in *E. coli*. *Molecules.* 2013; 18 (3): 2712–25.
15. Yin R, Dai T, Avci P, Jorge AE, de Melo WC, Vecchio DH. et al. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13: 731–62.

References

1. Fakayode OJ, Tsolekile N, Songca SP, Oluwafemi OS. Applications of functionalized nanomaterials in photodynamic therapy. *Biophys.* 2018; 2. doi: 10.1007/s12551-017-0383-2.
2. Rundle P. Photodynamic Therapy for Eye Cancer. *Biomedicines.* 2017; 5 (4): 69.
3. Meimandi M, Talebi Ardakani MR, Esmaeil Nejad A, Yousefnejad P, Saebi K, Tayeedy MH. The Effect of Photodynamic Therapy in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Review of Literature. *J Lasers Med Sci.* 2017; 8 (1): 7–11.
4. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004; 17: 245–54.
5. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 436–50.
6. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 33: 67–73.
7. Neundorff I, Reinhardt A. Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (5): 701.
8. Joseph B, Janam P, Narayanan S, Anil S. Is Antimicrobial Photodynamic Therapy Effective as an Adjunct to Scaling and Root Planing in Patients with Chronic Periodontitis? A Systematic Review *Biomolecules.* 2017; 7 (4): 79.
9. Liu CC, Zhao JJ, Zhang R1, Li H, Chen B, Zhang LL et al. Multifunctionalization of graphene and graphene oxide for controlled release and targeted delivery of anticancer drugs. *Am J Transl Res.* 2017; 9 (12): 5197–219.
10. Shmigol TA, Behalo VA, Syisolyatina EV, Nagurskaya EV, Ermolaeva SA, Potapenko AY. Vliyanie hlorida natriya na agregatsiyu merotsianina 540 i fotosensibilizirovannuyu inaktivatsiyu *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. *Acta Naturae.* 2011; 112–118.
11. Bilski P, McDevitt T, Chignell CF. Merocyanine 540 solubilized as an ion pair with cationic surfactant in nonpolar solvents: spectral and photochemical properties. *Photochem Photobiol.* 1999; 69 (6): 671–676.
12. Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown GE Jr. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ Sci Technol.* 2012; 3; 46 (13): 6900–14.
13. Kepczynski M, Dzieciuch M, Nowakowska M. Nano-structural hybrid sensitizers for photodynamic therapy. *Curr Pharm Des.* 2012; 18 (18): 2607–21.
14. Ragàs X, Xin He, Agut M, Roxo-Rosa M, Rocha Gonsalves A, Arménio C. Serra et al. Singlet Oxygen in Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photosensitizer-Dependent Production and Decay in *E. coli*. *Molecules.* 2013; 18 (3): 2712–25.
15. Yin R, Dai T, Avci P, Jorge AE, de Melo WC, Vecchio DH. et al. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13: 731–62.
16. Vatansever F, de Melo WC, Avci P, et al. 2013. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species — Bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013; 37 (6): 955–89.
17. Avci P, Erdem SS, Hamblin MR. Photodynamic Therapy: One Step Ahead with Self-Assembled Nanoparticles *J Biomed Nanotechnol.* 2014; 10 (9): 1937–52.

ОЦЕНКА РАЦИОНАЛЬНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПЕРИОПЕРАЦИОННОЙ АНТИМИКРОБНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ

Т. Е. Морозова, М. В. Лукина[✉], Т. Б. Андрущишина, М. А. Чукина

Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, лечебный факультет, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Назначение антибактериальных препаратов (АБП) для проведения периоперационной антимикробной профилактики (ПАП) пациентам хирургического профиля необходимо для снижения частоты возникновения инфекционных осложнений в послеоперационном периоде, в том числе инфекций области хирургических вмешательств. Целью работы была оценка рациональности и безопасности выбора АБП для проведения ПАП инфекционных осложнений у пациентов после хирургических вмешательств. Проведен фармакоэпидемиологический анализ 576 историй болезней пациентов в возрасте от 18 до 87 лет после хирургических вмешательств, средний возраст ($M \pm SD$) составил $57,4 \pm 14,5$ года, мужчин — 347 (60,2%), женщин — 229 (39,8%). В финальный анализ рациональности схем ПАП вошли 481 история болезни. Оценивали рациональность выбора антибактериальной терапии, частоту развития неблагоприятных побочных реакций (НПР), частоту и характер инфекционных осложнений. Показано, что выбор схем ПАП соответствовал рекомендациям в 207 (43,04%) случаях. Выявлена высокая частота несоблюдения рекомендаций по проведению ПАП (274; 56,96%) и нарушения сроков проведения ПАП (364; 75,7%). Общее число случаев нарушения режимов дозирования составило 225 (46,8%). Обнаружена взаимосвязь нерациональных схем ПАП с длительностью пребывания в ОРИТ ($p = 0,003$ и $p < 0,005$), частотой повторных оперативных вмешательств, ассоциированных с инфекцией ($p = 0,001$), уровнем летальности ($p = 0,002$) и выделением полирезистентных штаммов ($p = 0,016$). Таким образом, у пациентов хирургического профиля в условиях реальной клинической практики сохраняется высокая частота несоблюдения рекомендаций по проведению ПАП, нарушения сроков проведения ПАП и режимов дозирования АБП, что негативно сказывается на госпитальных показателях.

Ключевые слова: антибактериальные препараты, периоперационная антимикробная профилактика инфекционных осложнений хирургического вмешательства, рациональность применения, неблагоприятные побочные реакции

Благодарности: авторы благодарят Бабенко Олега Васильевича из УКБ № 1 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова за возможность доступа к архиву историй болезней.

✉ **Для корреспонденции:** Лукина Мария Владимировна
ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4, каб. 106, г. Москва, 119435; mari-luk2010@yandex.ru

Статья получена: 29.12.2017 **Статья принята к печати:** 23.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.012

ASSESSMENT OF PERIOPERATIVE PROPHYLAXIS OF INFECTIOUS COMPLICATIONS IN POST-OP PATIENTS

Morozova TE, Lukina MV[✉], Andrushishina TB, Chukina MA

Department of Clinical Pharmacology and Propedeutics of Internal Diseases, Faculty of General Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Perioperative antimicrobial prophylaxis (PAP) involves administration of antimicrobial agents (AMA) to patients undergoing a surgical intervention and aims to reduce the risk of postoperative infectious complications, especially at surgical sites. In the present work we assess efficiency and safety of AMA used for prevention of postoperative infectious complications. In the course of our study we pre-analyzed 576 medical histories of post-op patients aged 18 to 87 years (mean age $M \pm SD$ was 57.4 ± 14.5 years), of which 347 (60.2%) were male and 229 (39.8%) female. Only 481 histories were selected for final analysis. We assessed the choice of antibacterial therapy, the frequency of adverse reactions (AR) and infectious complications and the type of the latter. PAP regimens were consistent with the official guidelines in 207 (43.04%) cases. PAP recommendations were ignored in 274 cases (56.96%), and the timing was wrong in 364 cases (75.7%). Incorrect dosages were administered in 225 cases (46.8%). We also discovered an association between irrational PAP regimens and 1) the length of patient's stay in the intensive care unit ($p = 0.003$ and $p < 0.005$), 2) the frequency of reoperations associated with infection ($p = 0.001$), 3) mortality rates ($p = 0.002$), and 4) isolation of strains with multidrug resistance ($p = 0.016$). We conclude that PAP regimens for the inpatients of surgical wards are often compromised by failure to comply with the official guidelines, wrong timing and incorrect dosage, which negatively affects hospital statistics.

Keywords: antibacterial agents, perioperative antimicrobial prophylaxis, infectious complications, surgery, efficiency, adverse reactions

Acknowledgements: the authors thank Oleg Babenko of Clinical Hospital No.1 of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University for granting access to Hospital's archived medical records.

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria Lukina
Bolshaya Pirogovskaya 2, str. 4, k. 106, Moscow, 119435; mari-luk2010@yandex.ru

Received: 29.12.2017 **Accepted:** 23.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.012

Проведение периоперационной антимикробной профилактики (ПАП) с использованием антибактериальных препаратов (АБП) является общемировым стандартом ведения пациентов хирургического профиля и преследует цель снизить частоту развития инфекционных осложнений, в том числе инфекций области хирургических вмешательств (ИОХВ). Любые инфекционные осложнения в послеоперационном периоде негативно сказываются на результатах оперативного вмешательства, удлиняют время пребывания в стационаре, повышают затраты на лечение, потребность в проведении повторных оперативных вмешательств, влияют на показатели общебольничной летальности и требуют проведения дополнительной фармакотерапии [1].

Согласно данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний (ECDC) и Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время отмечается высокая частота инфекционных осложнений, ассоциированных с поли- и панрезистентными штаммами [2, 3].

Проблема растущей резистентности к АБП связана с различными факторами, ведущее значение среди которых имеют неоправданно высокая частота назначения и нерациональный выбор АБП [4]. В связи с этим особое значение приобретают вопросы проведения рациональной антибактериальной терапии в условиях реальной клинической практики [5]. Использование нерациональных доз препаратов, назначение субтерапевтических дозировок АБП как с лечебной, так и с профилактической целью, необоснованная длительность ПАП в послеоперационном периоде (более 24 ч) являются факторами, снижающими эффективность ПАП и способствующими росту антибиотикорезистентности [6, 7].

В РФ активно разрабатываются меры по сдерживанию роста антибиотикорезистентности. Согласно обновленным рекомендациям национальной программы СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии), необходимо активно проводить мероприятия по сдерживанию роста антибиотикорезистентности и контролю за распространением нозокомиальных инфекций в условиях многопрофильных стационаров [8]. При этом важными инструментами реализации данной стратегии являются проведение системного мониторинга распространения антимикробной резистентности и совершенствование мер по

осуществлению контроля за оборотом противомикробных препаратов [9].

Таким образом, рациональность назначения АБП в лечебно-профилактических учреждениях в различных клинических ситуациях — это один из способов снижения частоты ИОХВ, риска развития неблагоприятных побочных реакций (НПР) и сдерживания роста антибиотикорезистентности.

Целью исследования было оценить рациональность и безопасность выбора АБП для проведения ПАП инфекционных осложнений у пациентов после хирургических вмешательств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ структуры назначения АБП у пациентов хирургического профиля с профилактической целью, рациональности выбора схем ПАП и их соответствия национальным и международным клиническим рекомендациям [1, 10]. В базу данных вносили клинико-демографические данные пациентов (пол, возраст, основное и сопутствующие заболевания, уровень креатинина, клиренс креатинина до и после оперативного вмешательства), информацию о характере оперативного вмешательства (в том числе объем кровопотери и тип операционных ран, наличие осложнений, случаи НПР, режим дозирования АБП для периоперационной профилактики).

Для анализа были отобраны 576 историй болезни пациентов после хирургических вмешательств в период с июня по декабрь 2016 г. в возрасте от 18 до 87 лет; средний возраст ($M \pm SD$) составил $57,4 \pm 14,5$ года, мужчин — 347 (60,2%), женщин — 229 (39,8%). Подробная характеристика выборки представлена в табл. 1.

По профилю оперативных вмешательств можно выделить следующие группы: общая хирургия (356; 61,8%), кардиохирургия (177; 30,7%), онкохирургия (21; 3,6%). Большинству пациентов проводили плановые оперативные вмешательства (468; 81,3%). Среди типов операционных ран преобладали чистые раны — 310 (53,8%). Инфицированные раны были у 113 (19,6%) пациентов с гнойно-септическими заболеваниями различной локализации.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в фармакоэпидемиологический анализ

Показатель	Пациенты n = 576	Мужчины n = 347		Женщины n = 229		p
	M ± SD	M	SD	M	SD	
Возраст, лет	57,4 ± 14,5	57,8	13,6	56,9	15,6	0,468
ИМТ, кг/м ²	28,20 ± 5,67	27,70	4,80	29,01	6,80	0,005
Длительность госпитализации, сут.	18,10 ± 22,05	17,20	10,70	19,60	32,40	0,197
Срок развития инфекционных осложнений, сут.	1,5 ± 3,6	1,1	3,6	1,3	3,7	0,596
Срок развития неинфекционных осложнений, сут.	0,89 ± 4,39	0,88	2,70	0,90	6,20	0,942
Срок повторных оперативных вмешательств, сут.	1,18 ± 3,96	1,40	4,30	0,85	3,30	0,114
Длительность пребывания в ОРИТ, сут.	3,10 ± 7,60	2,76	6,20	3,63	9,20	0,180
Длительность ИВЛ, сут.	0,61 ± 4,12	0,30	2,67	1,04	5,60	0,041
Объем кровопотери, мл	214,1 ± 483,1	169,9	426,7	243,3	515,5	0,074
Креатинин ^{0*} , мг/дл	0,95 ± 0,49	1,05	0,56	0,83	0,32	< 0,0001
Креатинин ^{1**} , мг/дл	1,07 ± 0,94	1,13	0,76	0,98	1,16	0,058
Клиренс креатинина ^{0*} , мл/мин	96,80 ± 42,50	100,61	44,91	91,17	38,01	0,009
Клиренс креатинина ^{1**} , мл/мин	74,79 ± 52,20	76,32	48,79	72,48	57,03	0,401

Примечание: * — уровень креатинина крови и клиренс креатинина (по формуле Кокрофта–Голта) до оперативного вмешательства; ** — уровень креатинина крови и клиренс креатинина (по формуле Кокрофта–Голта) через 24–48 ч после оперативного вмешательства

Условно-чистые и контаминированные раны встречались в 70 (12,2%) и 84 (14,6%) случаях соответственно.

В финальный анализ рациональности выбора схем ПАП вошли 481 история болезни в связи с отсутствием в 95 (16,5%) картах достоверной информации о проведении ПАП.

С целью оценки рациональности и безопасности, проводимой ПАП анализировали:

- структуру назначения АБП;
- рациональность выбора препаратов и использованных схем ПАП, время введения, длительность приема АБП;
- частоту случаев НПР.

Рассматривали общую частоту инфекционных осложнений и ИОХВ в послеоперационном периоде.

Дополнительно проведен анализ влияния различных факторов, таких как схемы ПАП, клинко-демографические особенности пациентов (возраст, пол, ИМТ, характер основного заболевания, функционального состояния почек, вид оперативного вмешательства, тип ран, объем кровопотери), на риск развития инфекционных осложнений, общую длительность госпитализации, длительность пребывания в ОРИТ, риск развития НПР, летальность.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ статистического анализа STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде средних значений M и стандартного отклонения SD . При выборе метода анализа брали во внимание нормальность распределения выборок, которую оценивали с помощью W -теста Шапиро–Уилка, и однородность дисперсий, которую оценивали с помощью T -теста Фишера (при сравнении двух выборок). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Помимо корреляционного анализа, для сравнения двух независимых переменных непрерывного типа, не подчиняющихся закону нормаль-

ного распределения, использовали U -тест Манна–Уитни и критерий Колмогорова–Смирнова. Сравнение двух качественных независимых переменных производили с помощью двухстороннего F -теста Фишера либо теста χ^2 с поправкой Йетса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенный ретроспективный анализ историй болезни ($n = 481$) показал, что назначения АБП соответствовали рекомендациям в 207 (43,04%) случаях. В 274 (56,96%) случаях отмечен нерациональный выбор АБП для ПАП без учета типа операционных ран и особенностей оперативного вмешательства. Среди схем для проведения ПАП можно выделить высокую частоту назначения цефалоспоринов (ЦФ) III поколения, ротацию ЦФ I, II, III, IV поколений в течение периоперационного и послеоперационного периода, а также назначение карбапенемов и ингибитор-защищенных аминопенициллинов (ИЗАП) в комбинациях с аминогликозидами (амикацин), метронидазолом и фторхинолонами (ципрофлоксацин) пациентам с чистыми и условно-чистыми ранами. В исследуемой когорте общая частота нарушения сроков проведения ПАП отмечена в 364 (75,7%) случаях. Общее число случаев нарушения режимов дозирования составило 225 (46,8%).

Назначение рациональных схем ПАП (207; 43,04%) сопровождалось нарушениями режимов дозирования в 64 (30,9 %) случаях (табл. 2).

При этом нерациональный выбор АБП (274; 56,96%) в 364 (75,7%) случаях сопровождался нарушением длительности ПАП (продление более 24–48 ч) с тенденцией к назначению субтерапевтических доз в 161 (58,8%) случае (табл. 2, 3).

Таблица 2. Структура антибактериальных препаратов для периоперационной профилактики с учетом нерационального дозирования

Схема ПАП	Количество схем, n	Нарушение режима дозирования, n
1. Рациональные схемы ПАП	207	64
Цефалоспорины I, II	93	29
Цефалоспорины I + метронидазол	27	24
ИЗАП	87	11
2. Нерациональные схемы ПАП	274	161
Цефалоспорины III, IV	141	68
Цефалоспорины III, IV + метронидазол	72	56
Ротация цефалоспоринов I, II, III	39	23
Ротация цефалоспоринов с ванкомицином	11	8
Карбапенемы	7	2
ИЗАП в комбинациях с аминогликозидами, фторхинолонами	4	4

Таблица 3. Длительность проведения периоперационной профилактики

Срок проведения ПАП	Количество больных	
	абс.	%
Однократное введение АБП до операции	117	24,3
Варианты нерациональной длительности ПАП:	364	75,6
проведение ПАП в течение 24 ч	92	25,3
прием АБП в течение 48 ч	71	19,5
3–4 сут.	100	27,5
5–7 сут.	63	17,3
8–10 сут.	26	7,1
11–14 сут.	12	3,3

Анализ безопасности антибактериальных препаратов для проведения периоперационной профилактики

Ретроспективный анализ медицинской документации показал, что общее количество НПР составило 23 (3,99%) случая, все в группе пациентов, которым длительно проводили ПАП. Не были зафиксированы НПР в группе пациентов, получавших ПАП до операции, и в группе с длительностью ПАП до 48 ч. Таким образом, риск развития НПР возрастает по мере увеличения длительности ПАП (табл. 4).

Были отмечены следующие НПР:

- антибиотик-ассоциированный колит — 9 (39,1%);
- психомоторное возбуждение — 6 (26,1%);
- псевдоаллергические реакции — 3 (13,0%);
- повышение трансаминаз — 3 (13,0%);
- антибиотик-ассоциированная нефропатия (ванкомицин) — 2 (8,6%);
- удлинение интервала Q–T — 2 (8,6%).

Последующий корреляционный анализ выявил положительные связи между развитием НПР и возрастом ($r = 0,109$; $p = 0,009$), длительностью госпитализации ($r = 0,291$; $p < 0,0001$), длительностью пребывания в ОРИТ ($r = 0,374$; $p < 0,0001$), летальным исходом ($r = 0,269$; $p < 0,0001$), уровнем послеоперационных осложнений неинфекционного генеза ($r = 0,340$; $p < 0,0001$), уровнем креатинина и клиренсом креатинина в послеоперационном периоде ($r = 0,256$; $p < 0,0001$). Отсутствовали корреляционные связи между НПР и наличием аллергоанамнеза ($r = 0,039$; $p = 0,348$), рациональностью выбора схем ПАП ($r = 0,340$; $p = 0,387$), адекватностью режимов дозирования АБП ($r = 0,028$; $p = 0,504$), длительностью ПАП ($r = 0,017$; $p = 0,687$) и инфекционными осложнениями ($r = 0,032$; $p = 0,443$).

U-тест Манна–Уитни и критерий Колмогорова–Смирнова подтвердили наличие достоверной связи НПР с возрастом, длительностью госпитализации, длительностью пребывания в ОРИТ, длительностью проведения ИВЛ, послеоперационными осложнениями. Однако для летального исхода критерий Колмогорова–Смирнова не достигает достоверных значений, $p = 0,121$ (табл. 5). Стоит также отметить, что снижение клиренса креатинина в послеоперационном периоде было достоверным предиктором развития НПР на фоне применения АБП.

Частота инфекционных осложнений в послеоперационном периоде

Инфекционные осложнения в послеоперационном периоде были отмечены в 90 (15,6%) случаях, среди которых преобладали ИОХВ (45; 50%) и инфекции нижних дыхательных путей (31; 34,4%; в том числе нозокомиальная пневмония у 24 (77,4%) и нозокомиальный трахеобронхит у 7 (22,6%) пациентов); сепсис (7; 7,8%); интраабдоминальные инфекции (6; 6,7%); инфекция мочевыводящих путей (1; 1,1%); инфекционный эндокардит (1; 1,1%). Частота инфекционных осложнений у пациентов с различными типами операционных ран представлена в табл. 6.

ПАП проводили большинству пациентов с чистыми (91,3%) и условно-чистыми (91,6%) ранами, на ее фоне частота инфекционных осложнений составила 14,1 и 19,5% соответственно (табл. 6). Всем пациентам с контаминированными ранами проводили ПАП, частота инфекционных осложнений составила 27,1% ($n = 19$). Особенностью группы больных с инфицированными ранами было отсутствие достоверных данных о назначении пациентам (61; 54,5%) АБП для периоперационной профилактики (за 30–60 мин до операции), несмотря на назначение АБП в

Таблица 4. Частота развития нежелательных побочных реакций в зависимости от длительности периоперационной профилактики

Длительность ПАП	НПР	
	абс.	%
Однократное введение АБП до операции	0	–
Проведение ПАП в течение 24 ч	0	–
Прием АБП в течение 48 ч	5	21,7
3–4 сут.	3	13,0
5–7 сут.	3	13,0
8–10 сут.	5	21,7
11–14 сут.	7	30,4
Всего	23	100,0

Таблица 5. Взаимосвязь клинико-лабораторных характеристик и развития НПР

Характеристика	Неблагоприятные побочные реакции	
	p1 (U-тест Манна–Уитни)	p2 (критерий Колмогорова–Смирнова)
Возраст	0,025	0,315
Аллергоанамнез	$p = 0,308$	$p > 1$
Длительность ИВЛ	$< 0,0001$	0,017
Длительность пребывания в ОРИТ	$< 0,0001$	$< 0,0001$
Длительность госпитализации	$< 0,0001$	$< 0,0001$
Летальный исход	$< 0,0001$	0,121
Послеоперационные осложнения неинфекционного генеза	$< 0,0001$	$< 0,0001$
Уровень креатинина и клиренс креатинина в послеоперационном периоде	$< 0,0001$	$< 0,0001$
Инфекционные осложнения	$p = 0,165$	$p > 1$

послеоперационном периоде. В данной группе частота инфекционных осложнений была преимущественно выше у пациентов, которым не проводилась ПАП, 11 (18,03%), против 6 (11,8%) случаев инфекционных осложнений в группе, где ПАП проводили согласно стандартам. Повторные оперативные вмешательства потребовались в 86 (14,9%) случаях, из которых 32 (37,2%) случая были ассоциированы с инфекционными осложнениями, остальные 54 (62,8%) — не были.

В ходе исследования провели дополнительный статистический анализ, позволяющий оценить наличие взаимосвязей различных факторов, таких как нерациональные схемы ПАП с клинико-демографическими особенностями пациентов (возраст, пол, ИМТ, основное заболевание, функциональное состояние почек, характер оперативного вмешательства, тип ран, объем кровопотери) и частотой инфекционных осложнений, с потребностью в повторных оперативных вмешательствах, длительностью госпитализации, длительностью пребывания в ОРИТ, ростом полирезистентной флоры, уровнем летальности (табл. 7).

Высокая степень статистической значимости выявлена в отношении взаимосвязи нерациональных схем ПАП с уровнем летальности ($p = 0,002$), нерациональной длительности ПАП и нарушений режимов дозирования — с длительностью пребывания в ОРИТ ($p = 0,003$ и $p < 0,005$ соответственно). Нарушение режима дозирования также повышает потребность проведения повторных вмешательств, ассоциированных с инфекцией ($p = 0,001$).

Важным является и тот факт, что повышенный уровень креатинина через 24 ч после оперативного вмешательства, как маркер функционального состояния почек, имеет достоверные взаимосвязи с частотой инфекционных осложнений ($p = 0,006$), длительностью пребывания в ОРИТ ($p = 0,049$), длительностью госпитализации ($p = 0,001$) и уровнем летальности ($p = 0,003$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рациональное проведение ПАП — один из основных инструментов регулирования внутрибольничной инфекции у пациентов хирургического профиля. Проведение ПАП преследует цель снизить уровень послеоперационных осложнений, длительность пребывания в ОРИТ, в стационаре, показатели летальности от гнойно-септических осложнений. В изучении приверженности рекомендациям по проведению рациональной ПАП необходимо активное участие специалистов различного профиля: хирургов, анестезиологов, клинических фармакологов, эпидемиологов и администрации.

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что проводимая ПАП соответствует международным и национальным рекомендациям в 52,4%. Достаточно высокий уровень несоответствия рекомендациям режимов ПАП (47,6%) характеризуется нерациональным выбором антибактериального препарата, необоснованной длительностью (85,4%) и нарушением режимов дозирования (66,4%).

Необходимо отметить, что наши данные во многом согласуются с данными исследований Khan и соавт. [11], Vessal и соавт. [12] и El Hassan и соавт. [13] о недостаточной приверженности рекомендациям по проведению ПАП у пациентов хирургического профиля, при этом разброс приверженности рекомендациям варьирует от 1,7 до 82%. В большинстве этих исследований авторы делали акцент на изучение приверженности рекомендациям по времени назначения ПАП до операции.

По данным обзора Gouvêa и соавт., показатель приверженности схемам ПАП в изученных исследованиях составил 70,3–95%, рациональное назначение ПАП отмечено в 22–95%, нерациональное использование — в 2,3–100%, нарушение сроков введения АБП до операции — в 73–100%, общее соблюдение сроков ПАП — в 5,8–91,4% [14].

Таблица 6. Частота развития и характер инфекционных осложнений у больных с различными типами ран при проведении периоперационной профилактики

Инфекционные осложнения n = 90 (15,6%)	Тип ран, n (%)			
	чистые n = 310	условно-чистые n = 84	контаминированные n = 70	инфицированные n = 112
ИОХВ	15 (5,3)	6 (7,8)	12 (7,1)	4 (7,8)
Нозокомиальная пневмония	15 (5,3)	3 (3,9)	4 (5,7)	0
Сепсис	5 (1,8)	1 (1,3)	0	0
Прочие*	5 (1,8)	5 (6,5)	3 (4,3)	2 (3,9)
Всего	40 (14,1)	15 (19,5)	18 (27,1)	6 (11,8)
Проведение ПАП	283 (91,3)	77 (91,6)	70 (100)	51 (45,7)

Примечание: * — инфекционный эндокардит, инфекция мочевыводящих путей, нозокомиальный трахеобронхит, интраабдоминальные инфекции

Таблица 7. Влияние нерационального назначения схем ПАП на госпитальные показатели

Нерациональная схема ПАП	p (U-критерий Манна–Уитни)					
	инфекционные осложнения	длительность пребывания в ОРИТ	длительность госпитализации	повторные операции, ассоциированные с инфекцией	наличие полирезистентной флоры в посевах	летальный исход
Превышение длительности ПАП	> 1	0,003	0,530	0,934	0,290	0,465
Нарушение режима дозирования	0,603	<0,005	0,500	0,001	0,016	0,980
Повышение креатинина через 24 ч после оперативного вмешательства	0,006	0,049	0,001	0,567	0,899	0,003
Все схемы	0,900	0,116	0,206	0,103	0,610	0,002

В ходе ретроспективного исследования Prospero и соавт. изучили приверженность рекомендациям за 6-летний период, которая составила 58%, при этом на частоту инфекционных осложнений в послеоперационном периоде наибольшее влияние оказывали длительность операции (OR 1,68; 95% CI: 1,56–1,82) и срочное оперативное вмешательство (OR 2,16; 95% CI: 1,96–2,37). Авторы также отметили, что несмотря на достаточно низкую приверженность рекомендациям по ПАП, в группе, где соблюдали протоколы проведения ПАП, наблюдалось снижение частоты инфекционных осложнений [15].

С целью преодоления низкой приверженности рекомендациям эксперты ВОЗ советуют использовать чек-листы для периоперационного ведения больных, в том числе для соблюдения режима проведения ПАП, что должно способствовать улучшению междисциплинарной комплаентности при проведении ПАП [16].

Кроме изучения комплаентности рекомендациям ПАП, особое внимание ряд исследователей уделял исследованию структуры назначения АБП для проведения ПАП. По нашим данным, отмечен высокий уровень назначения ЦФ III поколения, в том числе с антисинегнойной активностью. Результаты международных исследований Lautenbach и соавт. [17], Rodríguez-Baño и соавт. [18] демонстрируют высокий уровень корреляции между применением ЦФ III поколения и распространением штаммов продуцентов β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Результаты нашего микробиологического мониторинга ($n = 84$) косвенно свидетельствуют о высоком уровне выделения штаммов БЛРС+ (22; 26,2%). Появление штаммов, обладающих устойчивостью к карбапенемам Carb+ (23; 27,4%), также является тревожным фактом, поскольку при развитии инфекционных осложнений, ассоциированных с такими госпитальными штаммами, спектр выбора АБП резко ограничен.

Полученные нами данные о безопасности назначения АБП (случаи развития НГР — 23; 3,99%) свидетельствуют о достаточно высокой частоте антибиотик-ассоциированного колита на фоне применения ЦФ (9; 1,6%) и эпизодов психомоторного возбуждения у больных пожилого возраста на фоне назначения ципрофлоксацина в комбинациях с метронидазолом (6; 1,04%). По данным эпидемиологических исследований, антибиотик-ассоциированная диарея развивалась у 8% госпитализированных больных, из которых в 1–3% случаев было отмечено фебрильное течение. Авторы исследования пришли к выводам, что кроме АБП факторами риска могут быть антихолинергические препараты и препараты, замедляющие перистальтику кишечника [19].

По данным обзора Grill и соавт., распространенность неврологических нарушений на фоне назначения паци-

ентам хирургического профиля фторхинолонов в комбинациях достаточно высока. При этом спектр нарушений включает не только эпизоды психомоторного возбуждения, но и эпизоды судорог, миоклонус, делирий, дизартрию, атаксию. Наиболее часто тяжелые неврологические реакции были отмечены в группе пожилых пациентов и у пациентов с отягощенным неврологическим анамнезом. Авторы отмечают, что неврологические побочные реакции возникают с одинаковой частотой на фоне применения любых фторхинолонов [20].

Увеличение риска развития НГР на фоне длительной избыточной ПАП является весомым аргументом в пользу следования существующим рекомендациям. Данные корреляционного анализа нашего исследования свидетельствуют о связи НГР с такими показателями, как длительность госпитализации ($r = 0,291$, $p < 0,0001$), длительность пребывания в ОРИТ ($r = 0,374$; $p < 0,0001$), уровень летальности ($r = 0,269$; $p < 0,0001$), длительность ИВЛ ($r = 0,249$; $p < 0,0001$).

Особое внимание обращает на себя факт взаимосвязи уровня креатинина и клиренса креатинина ($p < 0,0001$), как маркера нарушения функции почек, с частотой развития НГР на фоне назначения АБП. В исследованиях [21, 22] было показано, что снижение функции почек ведет к изменению параметров фармакокинетики АБП и в ряде случаев увеличивает риск развития НГР, в том числе жизнеугрожающих. Данные результаты требуют проведения дополнительных проспективных исследований.

ВЫВОДЫ

В реальной клинической практике сохраняется низкий уровень приверженности рекомендациям по проведению периоперационной профилактики.

Показана взаимосвязь использования нерациональных комбинаций с уровнем летальности, нерациональной длительности ПАП с длительностью пребывания в ОРИТ, нарушений режимов дозирования АБП с частотой повторных оперативных вмешательств, ассоциированных с инфекцией, и длительностью пребывания в ОРИТ.

НГР достоверно являются факторами риска увеличения длительности ИВЛ, длительности пребывания в ОРИТ и длительности госпитализации.

С учетом выявленного достоверного влияния уровня креатинина на риск развития инфекционных осложнений и уровень летальности можно предполагать высокую прогностическую значимость функции почек, что требует проведения дополнительных проспективных клинических исследований в данной когорте пациентов.

Литература

1. Асланов Б. И., Зуева Л. П., Колосовская Е. Н., Любимова А. В., Хорошилов В. Ю., Долгий А. А. и др. Принципы организации периоперационной антибиотикопрофилактики в учреждениях здравоохранения. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2014. 42 с.
2. Gu Y, Kaku M. How can we fight against antimicrobial-resistant bacteria in the World Health Organization Western Pacific Region? Western Pac Surveill Response J. 2012 Jul 30; 3 (3): 40–2.
3. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. Clin Infect Dis. 2014 Sep 15; 59 Suppl 2: 71–5.
4. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. Front Public Health. 2014 Sep 16; 2: 145.
5. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, et al. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. Am J Health Syst Pharm. 2013 Feb 1; 70 (3): 195–283.

6. Harbarth S, Samore MH, Lichtenberg D, Carmeli Y. Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effect on surgical site infections and antimicrobial resistance. *Circulation*. 2000 Jun 27; 101 (25): 2916–21.
7. Kachroo S, Dao T, Zabaneh F, Reiter M, Larocco MT, Gentry LO, et al. Tolerance of vancomycin for surgical prophylaxis in patients undergoing cardiac surgery and incidence of vancomycin-resistant enterococcus colonization. *Ann Pharmacother*. 2006 Mar; 40 (3): 381–5.
8. Яковлев С. В., Журавлева М. В., Проценко Д. Н., Белобородов В. Б., Брико Н. И., Брусина Е. Б. и др. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи. Методические рекомендации для лечебно-профилактических учреждений Москвы. *Consilium Medicum. Хирургия. (Прил.)* 2017; 7.1: 15–51.
9. Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р «О Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г.».
10. ASHP therapeutic guidelines on antimicrobial prophylaxis in surgery. American Society of Health-System Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm*. 1999 Sep 15; 56 (18): 1839–88.
11. Khan AKA, Mirsh PV, Rashed MR, Banu G. A study on the usage pattern of antimicrobial agents for the prevention of surgical site infections (SSIs) in a tertiary care teaching hospital. *J Clin Diagn Res*. 2013 Apr; 7 (4): 671–4.
12. Vessal G, Namazi S, Davarpanah MA, Foroughinia F. Evaluation of prophylactic antibiotic administration at the surgical ward of a major referral hospital, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*. 2011 Aug; 17 (8): 663–8.
13. El Hassan M, Elnour AA, Farah FH, Shehab A, Al Kalbani NM, Asim S, et al. Clinical pharmacists' review of surgical antimicrobial prophylaxis in a tertiary hospital in Abu Dhabi. *Int J Clin Pharm*. 2015 Feb; 37 (1): 18–22.
14. Gouvêa M, Novaes Cde O, Pereira DM, Iglesias AC. Adherence to guidelines for surgical antibiotic prophylaxis: a review. *Braz J Infect Dis*. 2015 Sep–Oct; 19 (5): 517–24.
15. Prospero E, Barbadoro P, Marigliano A, Martini E, D'Errico M. Perioperative antibiotic prophylaxis: improved compliance and impact on infection rates. *Epidemiol Infect*. 2011 Sep; 139 (9): 1326–31.
16. Практическое руководство по использованию контрольного перечня ВОЗ по хирургической безопасности, 2009 г. Безопасная хирургия спасает жизни [файл из интернета]. Женева, Швейцария: ВОЗ; 2009 [дата обращения: 15 января 2018 г.]; 20 с. Доступно по: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44186/9789244598597_rus.pdf?jsessionid=4FAB6A191F92C8A475119413079895C3?sequence=7
17. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001 Apr 15; 32 (8): 1162–71.
18. Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Cisneros JM, Peña C, et al. Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010 May; 48 (5): 1726–31.
19. Greenstein AJ, Byrn JC, Zhang LP, Swedish KA, Jahn AE, Divino CM. Risk factors for the development of fulminant *Clostridium difficile* colitis. *Surgery*. 2008 May; 143 (5): 623–9.
20. Grill MF, Maganti RK. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Sep; 72 (3): 381–93.
21. Harris DG, McCrone MP, Koo G, Weltz AS, Chiu WC, Scalea TM, et al. Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill surgical patients. *J Crit Care*. 2015 Feb; 30 (1): 102–6.
22. Blot S, Lipman J, Roberts DM, Roberts JA. The influence of acute kidney injury on antimicrobial dosing in critically ill patients: are dose reductions always necessary? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 May; 79 (1): 77–84.

References

1. Aslanov BI, Zueva LP, Kolosovskaya EN, Lyubimova AV, Khoroshilov VYu, Dolgiy AA, et al. Printsipy organizatsii perioperatsionnoy antibiotikoprofilaktiki v uchrezhdeniyakh zdavookhraneniya. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. Moscow; 2014. 42 p. Russian.
2. Gu Y, Kaku M. How can we fight against antimicrobial-resistant bacteria in the World Health Organization Western Pacific Region? *Western Pac Surveill Response J*. 2012 Jul 30; 3 (3): 40–2.
3. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis*. 2014 Sep 15; 59 Suppl 2: S71–5.
4. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health*. 2014 Sep 16; 2: 145.
5. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, et al. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Am J Health Syst Pharm*. 2013 Feb 1; 70 (3): 195–283.
6. Harbarth S, Samore MH, Lichtenberg D, Carmeli Y. Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effect on surgical site infections and antimicrobial resistance. *Circulation*. 2000 Jun 27; 101 (25): 2916–21.
7. Kachroo S, Dao T, Zabaneh F, Reiter M, Larocco MT, Gentry LO, et al. Tolerance of vancomycin for surgical prophylaxis in patients undergoing cardiac surgery and incidence of vancomycin-resistant enterococcus colonization. *Ann Pharmacother*. 2006 Mar; 40 (3): 381–5.
8. Yakovlev SV, Zhuravleva MV, Protsenko DN, Beloborodov VB, Briko NI, Brusina EB, et al. [Antibiotic stewardship program for inpatient care. Clinical guidelines for Moscow hospitals]. *Consilium Medicum*. 2017; 19 (7.1. Surgery): 15–51. Russian.
9. Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 25 sentyabrya 2017 g. № 2045-r «O Strategii preduprezhdeniya rasprostraneniya antimirnoy rezistentnosti v RF na period do 2030 g.». Order of the Government of the Russian Federation. Russian.
10. ASHP therapeutic guidelines on antimicrobial prophylaxis in surgery. American Society of Health-System Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm*. 1999 Sep 15; 56 (18): 1839–88.
11. Khan AKA, Mirsh PV, Rashed MR, Banu G. A study on the usage pattern of antimicrobial agents for the prevention of surgical site infections (SSIs) in a tertiary care teaching hospital. *J Clin Diagn Res*. 2013 Apr; 7 (4): 671–4.
12. Vessal G, Namazi S, Davarpanah MA, Foroughinia F. Evaluation of prophylactic antibiotic administration at the surgical ward of a major referral hospital, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*. 2011 Aug; 17 (8): 663–8.
13. El Hassan M, Elnour AA, Farah FH, Shehab A, Al Kalbani NM, Asim S, et al. Clinical pharmacists' review of surgical antimicrobial prophylaxis in a tertiary hospital in Abu Dhabi. *Int J Clin Pharm*. 2015 Feb; 37 (1): 18–22.
14. Gouvêa M, Novaes Cde O, Pereira DM, Iglesias AC. Adherence to guidelines for surgical antibiotic prophylaxis: a review. *Braz J Infect Dis*. 2015 Sep–Oct; 19 (5): 517–24.
15. Prospero E, Barbadoro P, Marigliano A, Martini E, D'Errico M. Perioperative antibiotic prophylaxis: improved compliance and impact on infection rates. *Epidemiol Infect*. 2011 Sep; 139 (9): 1326–31.
16. Implementation Manual WHO surgical safety checklist 2009. Safe surgery saves lives [file on the Internet]. Geneva, Switzerland: WHO; 2009 [cited 2017 Apr 10]; 20 p. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44186/9789241598590_eng.pdf?sequence=1
17. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*

- and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001 Apr 15; 32 (8): 1162–71.
18. Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Cisneros JM, Peña C, et al. Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010 May; 48 (5): 1726–31.
 19. Greenstein AJ, Byrn JC, Zhang LP, Swedish KA, Jahn AE, Divino CM. Risk factors for the development of fulminant *Clostridium difficile* colitis. *Surgery*. 2008 May; 143 (5): 623–9.
 20. Grill MF, Maganti RK. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Sep; 72 (3): 381–93.
 21. Harris DG, McCrone MP, Koo G, Weltz AS, Chiu WC, Scalea TM, et al. Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill surgical patients. *J Crit Care*. 2015 Feb; 30 (1): 102–6.
 22. Blot S, Lipman J, Roberts DM, Roberts JA. The influence of acute kidney injury on antimicrobial dosing in critically ill patients: are dose reductions always necessary? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 May; 79 (1): 77–84.

АНАЛИЗ АССОЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ T>C RS767455 ГЕНА *TNFRSF1A* И T>G RS1061622 ГЕНА *TNFRSF1B* С РАЗВИТИЕМ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА

Л. В. Топчиева¹✉, И. В. Курбатова¹, О. П. Дуданова², А. А. Шиповская²

¹ Институт биологии, Федеральный исследовательский центр "Карельский научный центр Российской академии наук", Петрозаводск

² Медицинский институт, Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск

В этиологии и патогенезе неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) важны особенности питания, малоподвижный образ жизни и наследственность. Предполагают, что полиморфные варианты генов, кодирующих рецепторы к провоспалительному цитокину фактору некроза опухоли альфа (TNFα) (*TNFR1* и *TNFR2*), влияют на предрасположенность людей к развитию НАЖБП. Однако сведения о связи данного заболевания с носительством полиморфных вариантов генов *TNFR1* и *TNFR2* почти отсутствуют в литературе. Целью исследования было изучить связь полиморфных вариантов генов *TNFRSF1A* (T>C rs767455) и *TNFRSF1B* (T>G rs1061622) с развитием одной из форм НАЖБП — неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и их влияние на биохимические показатели крови. Методом ПЦР-ПДРФ генотипировали ДНК, выделенную из венозной крови 151 здорового донора и 242 пациентов с диагнозом НАСГ. Содержание TNFα оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). По результатам, связь полиморфного маркера T>C rs767455 гена *TNFRSF1A* с развитием НАСГ у жителей Карелии отсутствует. Обнаружена ассоциация с НАСГ полиморфного варианта T>G rs1061622 гена *TNFRSF1B*. У носителей аллеля G повышен риск развития данного заболевания OR = 4,83 (95% ДИ: 2,72–8,57). Влияние генотипа по T>G rs1061622 маркеру гена *TNFRSF1B* на содержание TNFα и активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) не выявлено. Сделано заключение, что полиморфный вариант T>G rs1061622 гена *TNFRSF1B* может быть вовлечен в предрасположенность населения Карелии к НАСГ.

Ключевые слова: неалкогольный стеатогепатит, наследственность, фактор некроза опухоли альфа, рецепторы к фактору некроза опухоли альфа, mbTNFR1, sTNFR, ген *TNFRSF1A*, ген *TNFRSF1B*, полиморфизм генов, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза

Финансирование: финансирование осуществлялось из федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № 0221-2017-0049) на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук», при поддержке стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2015–2017 гг.; в рамках «Программы стратегического развития Петрозаводского государственного университета в 2013–2017 г.», (НИОКР № 115070110006, ИКРБС № 216022450003), проекта «Разработка технологии скрининговой диагностики неалкогольной жировой болезни печени у лиц с избыточным весом и метаболическим синдромом» № 9173ГУ/2015 от 15.12.2015 г. программы «У.М.Н.И.К.».

✉ Для корреспонденции: Топчиева Людмила Владимировна
ул. Пушкинская, д. 11, г. Петрозаводск, 198910; Topchieva67@mail.ru

Статья получена: 31.10.2017 Статья принята к печати: 02.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.008

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN THE RS767455 T>C *TNFRSF1A* AND RS1061622 T>G *TNFRSF1B* POLYMORPHISMS AND NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Topchieva LV¹✉, Kurbatova IV¹, Dudanova OP², Shipovskaya AA²

¹ Institute of Biology, Karelian Research Center of RAS, Petrozavodsk, Republic of Karelia

² Institute of Medicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia

Poor diet, sedentary behavior and genetic background are major factors contributing to the etiology and pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). It is hypothesized that polymorphisms of the *TNFR1* and *TNFR2* genes coding for the receptors that bind the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNFα) can be implicated in the susceptibility to NAFLD, but not much data is available in the literature. In the present work we aimed to investigate a possible association between the rs767455 T>C *TNFRSF1A* and rs1061622 T>G *TNFRSF1B* polymorphisms and one of NAFLD forms, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and to assess their effect on blood biochemistry. Samples of DNA isolated from the venous blood of 151 healthy donors and 242 patients with NASH were genotyped using PCR-RFLP. TNFα concentrations were measured by ELISA. We have not found any association between the rs767455 T>C *TNFRSF1A* polymorphism and the development of NASH in the residents of Karelia. However, we have discovered an association between NASH and the T>G *TNFRSF1B* rs1061622 polymorphism. Carriers of the G allele have a higher risk of developing NASH (OR = 4.83; 95% CI: 2.72–8.57). The rs1061622 T>G genotype of the *TNFRSF1B* gene appears to have no effect on TNFα concentrations and the activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP). Our findings suggest a possible association between the rs1061622 T>G *TNFRSF1B* polymorphism and a risk of developing NASH in the residents of Karelia.

Keywords: non-alcoholic steatohepatitis, tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor alpha receptors, mbTNFR1, sTNFR, *TNFRSF1A* gene, *TNFRSF1B* gene, gene polymorphism, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase

Funding: this study was part of the public contract 0221-2017-0049 and was carried out using the equipment of the shared facility *Complex Basic and Applied Research of Living Systems in the Arctic* of the Institute of Biology, Karelian Research Center. The work was also sponsored by a scholarship of the President of the Russian Federation for young scientists and graduate students engaged in advanced research and development in priority areas of modernization of the Russian economy in 2015–2017 years. The authors also received support from Petrozavodsk State University as part of the efforts for its strategic development in 2013–2017 (R&D 115070110006, Information reference map 216022450003, registered February 24, 2016) under the project for the *Development of Technologies for Diagnostic Screening for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Overweight Patients and Patients with Metabolic Syndrome* (ID 9173GU/2015 dated December 15, 2015) of the UMNK program.

✉ Correspondence should be addressed: Ludmila Topchieva
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 198910; topchieva67@mail.ru

Received: 31.10.2017 Accepted: 02.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.008

Развитие и прогрессирование неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), одной из форм которой является неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), сопровождается повышением в плазме крови и печени провоспалительных цитокинов, в частности фактора некроза опухоли альфа (TNF α) [1, 2]. Повышенный уровень TNF α способствует воспалению печени, отложению в ней липидов и их перекисному окислению, активации клеток Купфера и апоптозу гепатоцитов, формированию инсулинорезистентности [3]. Снижение концентрации TNF α в плазме крови приводит к улучшению показателей функционального состояния печени [4, 5].

Белки семейства TNF проявляют свои биологические эффекты посредством взаимодействия с рецепторами суперсемейства TNFR[6]. Рецепторы к TNF α (mbTNFR) представлены двумя типами трансмембранных белков (mbTNFR1, mbTNFR2), отличающимися друг от друга наличием или отсутствием во внутриклеточной области домена смерти, активация которого приводит к запуску сигнальных путей апоптоза или некроптоза [7]. Помимо мембраносвязанных, существуют и растворимые рецепторы TNF α (sTNFR), образующиеся в результате отщепления внеклеточной части белка от mbTNFR с помощью металлопротеиназы семейства ADAM [8]. sTNFR связываются с TNF α и выступают как антагонисты mbTNFR, препятствуя запуску TNF α -сигнальных путей. В небольшой концентрации растворимые рецепторы TNF α обнаружены в сыворотке и моче здоровых людей. Уровень циркулирующих TNFR увеличивается при хроническом вирусном гепатите [9], циррозе печени [10], НАЖБП [11, 12], что указывает на развитие воспалительного процесса в организме при этих заболеваниях и активацию Т-клеточного иммунного ответа, в частности активацию CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих металлопротеиназу ADAM-17 [8]. Предполагается, что уровень и соотношение растворимых и мембраносвязанных рецепторов TNF α играет существенную роль не только в индукции процессов гибели гепатоцитов и повреждении печени, но и в процессах регенерации и поддержании гомеостаза этого органа [13, 14, 15, 16]. Вероятно, соотношение между растворимыми и мембраносвязанными формами TNFR1 и TNFR2 во многом определяет силу иммунного ответа и воспалительных реакций в организме. Оказывается, мутации в генах *TNFRSF1A* и *TNFRSF1B* влияют, соответственно, на содержание sTNFR1 и sTNFR2 в плазме крови и на количество mbTNFR1 и mbTNFR2 на поверхности клеток врожденного иммунитета [17]. В связи с этим можно предположить, что полиморфные варианты генов рецепторов TNF α могут вносить значительный вклад в этиологию и патогенез заболеваний печени, в частности НАСГ. В настоящее время предпринимаются попытки установить связь полиморфизма генов, кодирующих TNFR, с развитием НАЖБП. Однако такого рода данные еще малочисленны и касаются связи полиморфизма генов *TNFRSF1A* и *TNFRSF1B* с развитием билиарного цирроза, алкогольной болезни печени и гепатоцеллюлярной карциномы [18, 19, 20]. Сведения об ассоциации полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α с развитием НАЖБП практически отсутствуют в литературе. В связи с этим, целью исследования явилось изучение влияния полиморфных вариантов генов *TNFRSF1A* и *TNFRSF1B* на развитие НАСГ у жителей Карелии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал для исследования получен при содействии кафедры пропедевтики внутренних болезней и гигиены Ме-

дицинского института ПетрГУ и клинико-диагностической лаборатории НУЗ ОКБ на ст. Петрозаводск ОАО «РЖД». В исследовании использовали 242 образца венозной крови пациентов с НАСГ (110 мужчин и 132 женщин) и 151 образец крови здоровых доноров (64 мужчин и 87 женщин). Доноры, включенные в дальнейшем в контрольную группу (группу здоровых доноров), были также обследованы врачами НУЗ ОКБ на ст. Петрозаводск ОАО «РЖД» в ходе диспансеризации. Все испытуемые были разделены на клинические группы: контрольная группа — здоровые доноры, без клинических проявлений НАЖБП (возраст $48,04 \pm 2,26$ года); группа пациентов с диагнозом НАСГ (возраст $50,14 \pm 2,46$ года). Возраст представлен в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего. Возраст доноров двух групп исследования значимо не различался ($U = 132,5$; $p = 0,637$). Общими критериями включения пациентов в обе наблюдаемые группы, явились: лица обоих полов, давшие информированное согласие на проведение исследования, проживающие в Республике Карелия, с отсутствием вирусной этиологии хронического гепатита на основании отрицательных результатов исследования HBsAg вируса гепатита В и антител к вирусу гепатита С, а также с отсутствием алкогольной, лекарственной и аутоиммунной этиологии болезни печени на основании анамнестических, клинических, лабораторных данных. Критериями включения для больных НАСГ, кроме указанных, стали: впервые установленный диагноз НАЖБП слабой и умеренной активности до терапии (форма НАЖБП — НАСГ). Общими критериями исключения пациентов для обеих изучаемых групп явились: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение, сахарный диабет, индекс массы тела ≥ 30 кг/м², прием лекарственных, в том числе гепатотропных препаратов. Диагноз НАЖБП устанавливался на основании традиционных клинических, лабораторных, инструментальных и гистологических данных. Оценивались следующие лабораторные показатели крови: активность АлАТ и АсАТ, активность ЩФ (данные показатели определяли в автоматическом режиме на биохимическом анализаторе «RandomAccessF-15», «BioSystems», Испания). При ультразвуковом исследовании у всех больных выявлялось увеличение размеров печени и усиление эхогенности паренхимы органа. У части больных диагноз НАСГ подтвержден при гистологическом исследовании биоптатов печени.

Забор венозной крови для исследования в объеме 10 мл проводили до назначения лекарственных, в том числе гепатотропных, препаратов с использованием вакуумных пробирок с антикоагулянтном (ЭДТА). 250 мкл использовали для выделения ДНК. Часть венозной крови использовали для получения плазмы. Плазму крови объемом 200 мкл использовали для определения концентрации TNF α . Остальной объем крови был использован для определения биохимических показателей крови.

На проведение исследования получено согласие Комитета по медицинской этике Минздравсоцразвития РК и ПетрГУ (протокол № 39 от 15 ноября 2017 г.).

У части доноров, выбранных случайным образом, определяли содержание TNF α в плазме крови иммуноферментным методом (ИФА) с использованием набора «Human TNF α Platinum ELISA» («eBioscience», Австрия). Исследовали 30 образцов плазмы крови здоровых доноров (возраст $49,11 \pm 1,81$ года) и 60 образцов плазмы крови больных НАСГ (возраст $49,95 \pm 2,74$ года) с равным количеством мужчин и женщин в группах. Возраст лиц в исследуемых

группах достоверно не различался ($U = 181,5$; $p = 0,535$). Оптическую плотность раствора измеряли на микропланшетном фотометре Sunrise («Теска», Австрия) при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм.

ДНК выделяли из периферической крови на микроколонках с помощью набора «К-Сорб» (Синтол, Россия). Качество и количество ДНК определяли спектрофотометрически на приборе «SmartSpec» («Bio-Rad», США).

Для амплификации части гена *TNFRSF1A*, включающую позицию 339 (rs767455), использовали праймеры: прямой 5'agtggctgaggttaggac3' и обратный 5'ctatgccccgagtctcaac3', описанные в работе [21]. Для амплификации области гена *TNFRSF1B*, включающей позицию 587 (rs1061622), использовали праймеры: прямой 5'gcacacatcgtcactctc3' и обратный 5'aaggagtgaatgaatgagac3', описанные в работе [21]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе iCycler iQ5 («Bio-Rad», США), используя реакционную смесь («Евроген», Россия). ПЦР-продукты, содержащие rs767455, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BseI 1 (1 е.а.) («Сибэнзим», Россия) в течение 3 ч при 65 °C. ПЦР-продукты, содержащие rs1061622, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции FatI (1 е.а.) («Сибэнзим», Россия) в течение 1 ч при 55 °C. После рестрикции фрагменты ДНК разделяли в 1,5%-м агарозном геле, используя трис-ацетатный буфер.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statgraphics 2.1. Достоверность различий частот аллелей и генотипов в группах оценивали с помощью критерия χ^2 , биохимических показателей между группами — с помощью непараметрического критерия U Уилкоксона–Манна–Уитни. Непараметрический критерий для анализа был использован в связи с несоответствием распределений показателей в группах нормальному. Для оценки влияния генотипов на биохимические показатели использовали дисперсионный анализ Краскала–Уоллиса. Для оценки риска развития НАСГ рассчитывали отношение шансов (ОШ) с 95%-м доверительным интервалом (95% ДИ) [22]. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 и 2 представлены электрофореграммы продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов, содержащих rs767455 и rs1061622.

Проанализированы частоты аллелей и генотипов по полиморфному маркеру Т>С rs767455 гена *TNFRSF1A* в контрольной группе и группе пациентов с НАСГ.

Проводили тест на соответствие распределения равновесию Харди–Вайнберга. В контрольной группе и группе НАСГ обнаружено отклонение частот аллелей и генотипов от уравнения Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 8,25$ (df = 2, $p < 0,05$), $\chi^2 = 21,64$ (df = 2, $p < 0,05$) соответственно).

Как видно из табл. 1, частоты аллелей и генотипов по полиморфному маркеру Т>С (rs767455) гена *TNFRSF1A* не различались в группах здоровых доноров и больных НАСГ.

Проанализированы частоты аллелей и генотипов по 587Т>G полиморфному маркеру гена *TNFRSF1B* в контрольной группе и группе пациентов с НАСГ.

В исследованных группах не обнаружено отклонения частот аллелей и генотипов от уравнения Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0,30$ (df = 2, $p > 0,05$), $\chi^2 = 4,16$ (df = 2, $p > 0,05$) соответственно в группе здоровых доноров и группе больных НАСГ).

Как видно из табл. 2, распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера 587Т>G гена *TNFRSF1B*

различается в группах здоровых и больных НАСГ людей. Встречаемость аллеля G в группе лиц с диагнозом НАСГ значительно выше, чем в контрольной группе. У носителей аллеля G повышен риск развития данного заболевания (ОШ = 4,83 (95% ДИ: 2,72–8,57)).

Оценивали влияние rs1061622 гена *TNFRSF1B* на некоторые функциональные биохимические показатели состояния печени и содержание TNF α в плазме крови (табл. 3). Достоверные различия изучаемых показателей у носителей разных генотипов в двух сравниваемых группах не обнаружены. Не обнаружено влияние генотипа по указанному маркеру на биохимические показатели крови как в группе здоровых доноров, так и в группе пациентов с НАСГ ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы проанализировали связь полиморфных вариантов rs767455 гена *TNFRSF1A* и rs1061622 гена *TNFRSF1B* с развитием НАСГ. Указанные полиморфные варианты по данным литературы ассоциированы с рядом воспалительных заболеваний и изменением уровня TNF α в плазме крови [23]. Полиморфный вариант rs767455 представляет собой синонимическую мутацию, расположенную в позиции 36 первого экзона гена *TNFRSF1A*. Известно, что синонимические мутации могут влиять на правильность и эффективность сплайсинга мРНК, изменять ее структуру и влиять на фолдинг белков [24]. Показано, что замена аденина на гуанин в 36-й позиции гена *TNFRSF1A* приводит к изменению кодона CCA на CCG, что влияет на эффективность трансляции [25]. Кроме того, данная мутация в сочетании с другими мутациями (гаплотип T-A-T по rs4149570-rs767455-rs1800692) в гене *TNFRSF1A*

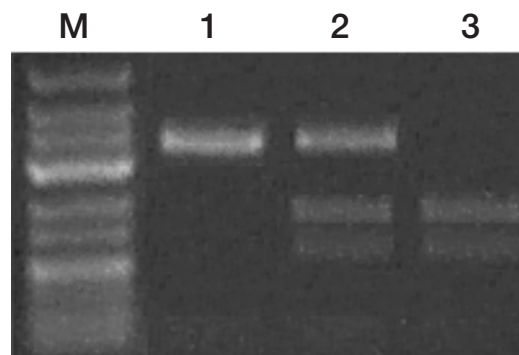


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов, содержащих rs767455: М — Thermo Scientific GeneRuler Low range DNA Ladder, 1 — генотип CC (330 п.н.), 2 — генотип TC (330, 184 и 146 п.н.), 3 — генотип TT (184 и 146 п.н.)

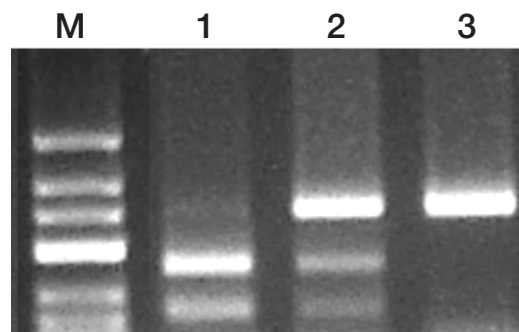


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов, содержащих rs1061622: М — Thermo Scientific GeneRuler Low range DNA Ladder, 1 — генотип TT (235 и 144 п.н.), 2 — генотип TG (379, 235 и 144 п.н.), 3 — генотип GG (379 п.н.)

Таблица 1. Распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру T>C rs767455 гена *TNFRSF1A* в группе пациентов с НАСГ и в контрольной группе

Аллели и генотипы	Контрольная группа (n = 131)	Пациенты с НАСГ (n = 242)	Критерий χ^2
T	119 (0,45)	229 (0,47)	0,24 (df = 1, p > 0,05)
C	143 (0,55)	255 (0,53)	
TT	35 (0,26)	72 (0,30)	0,61 (df = 2, p > 0,05)
TC	48 (0,37)	85 (0,35)	
CC	48 (0,37)	85 (0,35)	

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру T>G rs1061622 гена *TNFRSF1B* в группе пациентов с НАСГ и в контрольной группе

Аллели и генотипы	Контрольная группа (n = 151)	Пациенты с НАСГ (n = 133)	Критерий χ^2
T	206 (0,68)	116 (0,44)	16,60 (df = 1, p < 0,05)
G	96 (0,32)	150 (0,56)	
TT	69 (0,46)	20 (0,15)	37,07 (df = 2, p < 0,01)
TG	68 (0,45)	77 (0,58)	
GG	14 (0,09)	36 (0,27)	

Таблица 3. Некоторые показатели крови носителей разных генотипов по полиморфному маркеру 587T>G (rs1061622) гена *TNFRSF1B* в группах здоровых доноров и пациентов с НАСГ

Показатель	Контроль		НАСГ	
Генотип	TT (n = 14)	TG + GG (n = 16)	TT (n = 20)	TG + GG (n = 40)
АЛАТ, Ед./л	17,29 ± 2,05 (17,05)	18,31 ± 2,34 (18,27)	59,36 ± 8,53 (45,90)	65,56 ± 8,68 (48,30)
АСАТ, Ед./л	24,36 ± 2,64 (19,50)	22,08 ± 2,72 (19,09)	51,22 ± 9,65 (41,05)	51,51 ± 6,27 (35,60)
ЩФ, Ед./л	118,42 ± 10,82 (117,46)	123,51 ± 17,14 (125,48)	218,00 ± 18,70 (210,00)	214,26 ± 11,28 (197,00)
TNFα, пг/мл	5,53 ± 1,38 (4,69)	4,82 ± 0,39 (5,08)	6,09 ± 0,43 (5,83)	6,36 ± 0,27 (6,27)

Примечание: данные представлены в виде M ± m (Медиана).

способствует снижению пула мРНК без экзона 2 [26]. Нами не обнаружена ассоциация данного полиморфного маркера гена *TNFRSF1A* с развитием НАСГ среди обследованных лиц. Однако нами выявлена связь носительства аллеля G по T>G rs1061622 полиморфному маркеру гена *TNFRSF1B* с повышением риска развития НАСГ.

Полиморфный вариант rs1061622 гена *TNFRSF1B* представляет собой замену тимина на гуанин в позиции 587 экзона 6, которая приводит к замене аминокислотных остатков (метионин заменяется на аргинин) в позиции 196 трансмембранного домена белка, близко к сайту протеолитического расщепления металлопротеазами семейства ADAM. Указанная мутация влияет на процесс отщепления внеклеточного фрагмента трансмембранного белка и его выходу во внеклеточное пространство (эктодоменный шеддинг). Некоторые исследования показали, что у носителей генотипа TT (Met196) уровень sTNFRII ниже чем у лиц, имеющих Arg196-форму рецептора [27]. По данным других авторов, у носителей TT+TG генотипов по данному полиморфному маркеру уровень sTNFRII в плазме крови выше, чем у доноров с генотипом GG [28].

Таким образом, указанная мутация может способствовать изменению соотношения мембраносвязанных и растворимых TNFRII как в обычных физиологических условиях, так и при воспалении. Как уже отмечалось, у больных с различными заболеваниями печени наблюдается повышение содержания sTNFRI и sTNFRII в плазме крови и печени. Причем уровень этих белков может позитивно корре-

лировать с тяжестью заболевания [10, 12, 29, 30]. Однако физиологическая роль усиления эктодоменного шеддинга рецепторов TNFα при воспалении не совсем понятна. Так, увеличение содержания sTNFRII и связанное с ним уменьшение количества mbTNFRII на поверхности клеток могут привести к активации сигнальных путей, опосредованных mbTNFRII и направленных на индукцию апоптоза [7]. Помимо этого, растворимые формы TNFR могут функционировать в качестве физиологических аттенуаторов активности TNFα, конкурируя за лиганд с мембраносвязанными рецепторами. С другой стороны, растворимые рецепторы, вероятно, способны стабилизировать и сохранять циркулирующий растворимый TNFα и, таким образом, действовать как его агонисты [31].

Формы Met196 и Arg196 TNFRII различаются по своей способности опосредовать сигналинг TNF и активировать апоптоз или некроптоз. Так, в эпителиальных клетках линии HeLaS3, трансфицированных плазмидой pcDNA3.1, содержащей аллель Arg196 гена *TNFRII*, наблюдали снижение активности ядерного фактора κB и рекрутирования TRAF2 после стимуляции клеток рекомбинантным TNFα [32]. Последующая активация сигнального пути TNFRI в этих клетках приводила к индукции апоптоза, тогда как в клетках, трансфицированных плазмидой с аллелем дикого типа Met196, выживаемость клеток была на более высоком уровне. Необходимо отметить, что НАСГ сопровождается активацией гибели гепатоцитов [33]. Можно предположить, что полиморфный вариант rs1061622 гена

TNFRSF1B вносит свой вклад в формирование и прогрессирование НАСГ через индукцию сигнальных путей, определяющих гибель клеток печени.

Другой механизм вовлечения полиморфного варианта rs1061622 гена *TNFRSF1B* в этиологию и патогенез НАСГ может быть связан с его влиянием на уровень провоспалительных цитокинов [34]. Мы исследовали содержание TNF α в плазме крови носителей разных аллелей и генотипов по указанному полиморфному маркеру в группах здоровых и больных НАСГ людей. Однако достоверных различий в уровне этого цитокина в группах сравнения мы не выявили. Несмотря на это, мы не будем строго утверждать об отсутствии влияния полиморфного варианта rs1061622 гена *TNFRSF1B* на содержание TNF α , поскольку полученные результаты могут быть следствием как статистических

флуктуаций из-за малочисленности выборки, по крайней мере, в группе здоровых доноров, так и влияния других факторов на этот показатель. Эти обстоятельства требуют дальнейшего изучения механизмов вовлечения указанного полиморфного маркера в этиологию и патогенез НАСГ.

ВЫВОДЫ

Не обнаружена связь носительства полиморфного варианта T>C rs767455 гена *TNFRSF1A* с развитием НАСГ у жителей Карелии. Выявлена ассоциация полиморфного варианта T>G rs1061622 гена *TNFRSF1B* с развитием НАСГ. Указанный полиморфный маркер может быть вовлечен в генетическую предрасположенность жителей Карелии к НАСГ.

Литература

1. Lebensztejn DM, Kowalczyk D, Tarasów E, Skiba E, Kaczmarek M. Tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors in obese children with NAFLD. *Adv Med Sci.* 2010; 55 (1): 74-9. PubMed PMID: 20371430. DOI: 10.2478/v10039-010-0008-5.
2. Bocsan IC, Milaciu MV, Pop RM, Vesa SC, Ciuraru L, Matei DM et al. Cytokines genotype-phenotype correlation in nonalcoholic steatohepatitis. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:4297206. Epub 2017 Aug 9. PubMed PMID: 28852433. DOI: 10.1155/2017/4297206.
3. Brauner-Reuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology.* 2012; 18: 727-35. PubMed PMID: 22371632. DOI: 10.3748/wjg.v18.i8.727.
4. Lee Y-M, Sutudja DS, Wai C-T, Dan Y-Y, Aung M-O, Zhou L et al. A randomized controlled pilot study of Pentoxifylline in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatol Int.* 2008; 2 (2): 196-201. PubMed PMID: 19669304. DOI: 10.1007/s12072-008-9058-1.
5. Kakino S, Ohki T, Nakayama H, Yuan X, Otabe S, Hashinaga T et al. Pivotal role of TNF- α in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in a murine model. *Horm Metab Res.* 2017 Sep 18. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 28922680. DOI: 10.1055/s-0043-118666.
6. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 104: 487-501. PubMed PMID: 11239407.
7. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular Signalling.* 2012; 24: 1297-1305. PubMed PMID: 22374304. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006.
8. DeBerge MP, Ely KH, Wright PF, Thorp EB, Enelow RI. Shedding of TNF receptor 2 by effector CD8+ T cells by ADAM17 is important for regulating TNF- α availability during influenza infection. *J Leukoc Biol.* 2015; 98: 423-34. PubMed PMID: 26019295. DOI: 10.1189/jlb.3A0914-432RR.
9. Левитан Б. Н., Астахин А. В., Левитан Г. Б. Фактор некроза опухолей и его растворимые рецепторы II типа при хронических гепатитах и циррозах печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2017; 2: 62-6.
10. Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Increased serum leptin concentration correlate with soluble tumour necrosis factor receptor levels in patients with cirrhosis. *Clinical Endocrinol (Oxf).* 2002; 57: 805-11. PubMed PMID: 12460331.
11. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology.* 2004; 40: 46-54. PubMed PMID: 15239085.
12. Tokushige K, Takakura M, Tsuchiya-Matsushita N, Tanai M, Hashimoto E, Shiratori K. Influence of TNF gene polymorphisms in Japanese patients with NASH and simple steatosis. *J Hepatol.* 2007; 46: 1104-10. PubMed PMID: 17395331. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.01.028.
13. Tarrats N, Moles A, Morales A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Marí M. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatology.* 2011; 54: 319-27. PubMed PMID: 21523796. DOI: 10.1002/hep.24388.
14. Ijiri Y, Katoa R, Sadamatsua M, Takano M, Okadac Y, Tanaka K et al. Chronological changes in circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury. *Toxicology.* 2014; 316: 55-60. PubMed PMID: 24389507. DOI: 10.1016/j.tox.2013.12.004.
15. Sorg U, Behnke K, Degrandi D, Reich M, Keitel V, Herebian D et al. Cooperative role of lymphotoxin b receptor and tumor necrosis factor receptor p55 in murine liver regeneration. *Journal of Hepatology.* 2016; 64: 1108-17. PubMed PMID: 26708145. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.12.006.
16. Lana JP, Martins LB, Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Yamada LT, Vieira LQ et al. TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41: 1295-1302. PubMed PMID: 27863204. DOI: 10.1139/apnm-2016-0265.
17. Sennikov SV, Vasilyev FF, Lopatnikova JA, Shkaruba NS, Silkov AN. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:745909. Epub 2014 Mar 24. PubMed PMID: 24782596. DOI: 10.1155/2014/745909.
18. Wang J, Ni H, Chen L, Liu YX, Chen CB, Song WQ. Preparation and analysis of cSNP chip on hepatocellular carcinoma-related genes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005; 4: 398-402. PubMed PMID: 16109524.
19. Machado MV, Martins A, Almeida R, Marques-Vidal P, Gonçalves MS, Camilo ME et al. Does the simultaneous tumor necrosis factor receptor 2, tumor necrosis factor promoter gene polymorphism represent a higher risk for alcoholic liver disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21: 201-5. PubMed PMID: 19212208. DOI: 10.1097/MEG.0b013e32831016e0.
20. Liu X, Invernizzi P, Lu Y, Kosoy R, Lu Y, Bianchi I et al. Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2010; 42: 658-60. PubMed PMID: 20639880. DOI: 10.1038/ng.627.
21. Xu F, Zhou G, Han S, Yuan W, Chen S, Fu Z et al. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. *PloS One.* 2014; 9 (7): e101138. PubMed PMID: 25010932. DOI: 10.1371/journal.pone.0101138.
22. Флетчер Р. Клиническая эпидемиология. М.: Изд-во «Медиа-Сфера»; 1998. 352 с.
23. Glossop JR, Dawes PT, Nixon NB, Matthey DL. Polymorphism in the tumor necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2005; 7: 1227-

34. PubMed PMID: 16277675. DOI: 10.1186/ar1816.
24. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol.* 2009; 578: 23–39. PubMed PMID: 19768585. DOI: 10.1007/978-1-60327-411-1-2.
25. Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N, Takazoe M, Muramatsu M. Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor receptor superfamily 1A and 1B affect responses to infliximab in Japanese patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27: 765–70. PubMed PMID: 18248655. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03630.x.
26. Rittore C, Sanchez E, Soler S, Albers M, Obici L, McDermott MF et al. Grandemange SOR10-002 - A novel TNFR1 transcript of TRAPS gene. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2013; 11: A186. PMCID: PMC3953180. DOI: 10.1186/1546-0096-11-S1-A186.
27. Tolusso B, Sacco S, Gremese E, La Torre G, Tomietto P, Ferraccioli GF. Relationship between the tumor necrosis factor receptor II (TNF-RII) gene polymorphism and sTNF-RII plasma levels in healthy controls and in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* 2004; 65 (12): 1420–6. PubMed PMID: 15603867. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.06.010.
28. Stark GL, Dickinson AM, Jackson GH, Taylor PR, Proctor SJ, Middleton PG. Tumor necrosis factor receptor type II 196M/R genotype correlates with circulating soluble receptor levels in normal subjects and with graft-versus-host disease after sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation.* 2003; 76: 1742–49. PubMed PMID: 14688526. DOI: 10.1097/01.TP.0000092496.05951.D5.
29. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology.* 2001; 34: 1158–63. PubMed PMID: 11732005.
30. Cubillas R, Kintner K, Phillips F, Karandikar NJ, Thiele DL, Brown GR. Tumor necrosis factor receptor 1 expression is upregulated in dendritic cells in patients with chronic HCV who respond to therapy. *Hepat Res Treat.* 2010; 2010: 429243. PMCID: PMC2989713. DOI: 10.1155/2010/429243.
31. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 231–240. PubMed PMID: 8971478.
32. Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, Mascheretti-Croucher S, Croucher PJ, Schäfer H et al. The Met196Arg variation of human TNFR2 affects TNF alpha induced apoptosis by impaired NF- κ B-signalling and target gene expression. *J Biol Chem.* 2005; 280: 5994–6004. PubMed PMID: 15572357. DOI: 10.1074/jbc.M411541200.
33. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev.* 2010; 90: 1165–1194. PubMed PMID: 20664081.
34. Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hattori N, Kikuchi Y, Arinobu Y et al. Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44 (12): 2819–27. PubMed PMID: 11762942.
1. Lebensztejn DM, Kowalczyk D, Tarasów E, Skiba E, Kaczmarek M. Tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors in obese children with NAFLD. *Adv Med Sci.* 2010; 55 (1): 74–9. PubMed PMID: 20371430. DOI: 10.2478/v10039-010-0008-5.
2. Bocsan IC, Milaciu MV, Pop RM, Vesa SC, Ciurmarnean L, Matei DM et al. Cytokines genotype-phenotype correlation in nonalcoholic steatohepatitis. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:4297206. Epub 2017 Aug 9. PubMed PMID: 28852433. DOI: 10.1155/2017/4297206.
3. Braunerreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology.* 2012; 18: 727–35. PubMed PMID: 22371632. DOI: 10.3748/wjg.v18.i8.727.
4. Lee Y-M, Sutedja DS, Wai C-T, Dan Y-Y, Aung M-O, Zhou L et al. A randomized controlled pilot study of Pentoxifylline in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatol Int.* 2008; 2 (2): 196–201. PubMed PMID: 19669304. DOI: 10.1007/s12072-008-9058-1.
5. Kakino S, Ohki T, Nakayama H, Yuan X, Otabe S, Hashinaga T et al. Pivotal role of TNF- α in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in a murine model. *Horm Metab Res.* 2017 Sep 18. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 28922680. DOI: 10.1055/s-0043-118666.
6. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 104: 487–501. PubMed PMID: 11239407.
7. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular Signalling.* 2012; 24: 1297–1305. PubMed PMID: 22374304. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006.
8. DeBerge MP, Ely KH, Wright PF, Thorp EB, Enelow RL. Shedding of TNF receptor 2 by effector CD8+ T cells by ADAM17 is important for regulating TNF- α availability during influenza infection. *J Leukoc Biol.* 2015; 98: 423–34. PubMed PMID: 26019295. DOI: 10.1189/jlb.3A0914-432RR.
9. Levitan BN, Astahin AV, Levitan GB. Faktor nekroza opuholej i ego rastvorimye receptory II tipa pri hronicheskikh gepatitah i cirrozah pecheni. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija.* 2017; 2: 62–6. Russian.
10. Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Increased serum leptin concentration correlate with soluble tumour necrosis factor receptor levels in patients with cirrhosis. *Clinical Endocrinol (Oxf).* 2002; 57: 805–11. PubMed PMID: 12460331.
11. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adipo-nectin? *Hepatology.* 2004; 40: 46–54. PubMed PMID: 15239085.
12. Tokushige K, Takakura M, Tsuchiya-Matsushita N, Taniai M, Hashimoto E, Shiratori K. Influence of TNF gene polymorphisms in Japanese patients with NASH and simple steatosis. *J Hepatol.* 2007; 46: 1104–10. PubMed PMID: 17395331. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.01.028.
13. Tarrats N, Moles A, Morales A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Mari M. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatology.* 2011; 54: 319–27. PubMed PMID: 21523796. DOI: 10.1002/hep.24388.
14. Ijiri Y, Kato R, Sadamatsu M, Takano M, Okadac Y, Tanaka K et al. Chronological changes in circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury. *Toxicology.* 2014; 316: 55–60. PubMed PMID: 24389507. DOI: 10.1016/j.tox.2013.12.004.
15. Sorg U, Behnke K, Degrandi D, Reich M, Keitel V, Herebian D, et al. Cooperative role of lymphotoxin b receptor and tumor necrosis factor receptor p55 in murine liver regeneration. *Journal of Hepatology.* 2016; 64: 1108–17. PubMed PMID: 26708145. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.12.006.
16. Lana JP, Martins LB, Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Yamada LT, Vieira LQ et al. TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41: 1295–1302. PubMed PMID: 27863204. DOI: 10.1139/apnm-2016-0265.
17. Sennikov SV, Vasilyev FF, Lopatnikova JA, Shkaruba NS, Silkov AN. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:745909. Epub 2014 Mar 24. PubMed PMID: 24782596. DOI: 10.1155/2014/745909.
18. Wang J, Ni H, Chen L, Liu YX, Chen CB, Song WQ. Preparation

- and analysis of cSNP chip on hepatocellular carcinoma-related genes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005; 4: 398–402. PubMed PMID: 16109524.
19. Machado MV, Martins A, Almeida R, Marques-Vidal P, Gonçalves MS, Camilo ME et al. Does the simultaneous tumor necrosis factor receptor 2, tumor necrosis factor promoter gene polymorphism represent a higher risk for alcoholic liver disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21: 201–5. PubMed PMID: 19212208. DOI: 10.1097/MEG.0b013e32831016e0.
 20. Liu X, Invernizzi P, Lu Y, Kosoy R, Lu Y, Bianchi I et al. Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2010; 42: 658–60. PubMed PMID: 20639880. DOI: 10.1038/ng.627.
 21. Xu F, Zhou G, Han S, Yuan W, Chen S, Fu Z et al. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. *PLoS One.* 2014; 9 (7): e101138. PubMed PMID: 25010932. DOI: 10.1371/journal.pone.0101138.
 22. Fletcher R. *Klinicheskaja jepidemiologija. M.: Izd-vo «Mediasfera»;* 1998. 352 p. Russian.
 23. Glossop JR, Dawes PT, Nixon NB, Matthey DL. Polymorphism in the tumor necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2005; 7: 1227–34. PubMed PMID: 16277675. DOI: 10.1186/ar1816.
 24. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol.* 2009; 578: 23–39. PubMed PMID: 19768585. DOI: 10.1007/978-1-60327-411-1-2.
 25. Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N, Takazoe M, Muramatsu M. Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor receptor superfamily 1A and 1B affect responses to infliximab in Japanese patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27: 765–70. PubMed PMID: 18248655. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03630.x.
 26. Rittore C, Sanchez E, Soler S, Albers M, Obici L et al. Grandemange SOR10-002 - A novel TNFR1 transcript of TRAPS gene. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2013; 11: A186. PMCID: PMC3953180. DOI: 10.1186/1546-0096-11-S1-A186.
 27. Tulusso B, Sacco S, Gremese E, La Torre G, Tomietto P, Ferraccioli GF. Relationship between the tumor necrosis factor receptor II (TNF-RII) gene polymorphism and sTNF-RII plasma levels in healthy controls and in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* 2004; 65 (12): 1420–6. PubMed PMID: 15603867. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.06.010.
 28. Stark GL, Dickinson AM, Jackson GH, Taylor PR, Proctor SJ, Middleton PG. Tumor necrosis factor receptor type II 196M/R genotype correlates with circulating soluble receptor levels in normal subjects and with graft-versus-host disease after sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation.* 2003; 76: 1742–49. PubMed PMID: 14688526. DOI: 10.1097/01.TP.0000092496.05951.D5.
 29. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology.* 2001; 34: 1158–63. PubMed PMID: 11732005.
 30. Cubillas R, Kintner K, Phillips F, Karandikar NJ, Thiele DL, Brown GR. Tumor necrosis factor receptor 1 expression is upregulated in dendritic cells in patients with chronic HCV who respond to therapy. *Hepat Res Treat.* 2010; 2010:429243. PMCID: PMC2989713. DOI: 10.1155/2010/429243.
 31. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 231–240. PubMed PMID: 8971478.
 32. Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, Mascheretti-Croucher S, Croucher PJ, Schäfer H et al. The Met196Arg variation of human TNFR2 affects TNF alpha induced apoptosis by impaired NF- κ B-signalling and target gene expression. *J Biol Chem.* 2005; 280: 5994–6004. PubMed PMID: 15572357, DOI: 10.1074/jbc.M411541200.
 33. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev.* 2010; 90: 1165–1194. PubMed PMID: 20664081.
 34. Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi Y, Arinobu Y et al. Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44 (12): 2819–27. PubMed PMID: 11762942.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВУЛЬГАРНОГО ИХТИОЗА И ЧАСТОТА МУТАЦИЙ R501X И 2282DEL4 В ГЕНЕ *FLG* В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

С. С. Амелина¹, Е. В. Дегтерева¹, Н. В. Петрова², А. В. Марахонов^{2,3}, В. Е. Темников¹, Н. Е. Петрина², М. А. Амелина⁴, Н. В. Ветрова⁵, Т. И. Пономарева¹, Р. А. Зинченко^{2,6} ✉

¹ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

² Медико-генетический научный центр, Москва

³ Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

⁴ Академия биологии и биотехнологии им. Д. И. Иванова, Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону

⁵ Центр генетики и репродуктивной медицины «Генетико», Москва

⁶ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Вульгарный ихтиоз (ВИ) — серьезное поражение кожного покрова, передающееся по наследству и активно изучаемое специалистами всего мира. Целью работы стала оценка распространенности ВИ и частот мутаций R501X и 2282del4 в гене *FLG* у населения Ростовской области. Проведено генетико-эпидемиологическое исследование широкого круга моногенной наследственной патологии у населения в 12 районах. Изучена частота мутаций R501X и 2282del4 в гене *FLG* у больных ВИ и в контрольной группе (здоровой популяции). Суммарная численность обследованных составила 497 460 чел. Выявлено 230 нозологических форм. Рассчитана распространенность ВИ в каждом районе и по области в целом, проведен сравнительный анализ с ранее обследованными популяциями. Средняя распространенность ВИ в области составила 1:5025 и соответствует среднему значению по России, равному 1:5151. Определено накопление ВИ в Целинском (1:1942) и Миллеровском районах (1:2032). Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов изучена частота мутаций R501X и 2282del4 в гене *FLG* у больных ВИ (58 пациентов) и в контрольной группе (127 здоровых неродственных индивидов). Частота мутации 2282del4 в гене *FLG* среди пациентов с ВИ составила 48,28% (соответствует данным по Европе), в контрольной группе 1,58%. Сравнительный анализ частоты мутации 2282del4 в гене *FLG* в двух группах показал, что среди пациентов с ВИ частота мутации (48,28%) 2282del4 в гене *FLG* в 30 раз превышает частоту в контрольной группе (1,58%), что косвенно подтверждает патогенное действие мутации в группе больных ВИ. Мутация R501X не выявлена у больных ВИ и в контрольной группе.

Ключевые слова: вульгарный ихтиоз, мутации R501X и 2282del4, ген *FLG*, генетико-эпидемиологическое исследование, Ростовская область

Финансирование: исследование выполнено при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01051.

✉ **Для корреспонденции:** Рена Абульфазовна Зинченко
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115478; renazinchenko@mail.ru

Статья получена: 17.11.2017 **Статья принята к печати:** 10.02.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.009

PREVALENCE OF ICHTHYOSIS VULGARIS AND FREQUENCY OF *FLG* R501X AND 2282DEL4 MUTATIONS IN THE POPULATION OF THE ROSTOV REGION

Amelina SS¹, Degtereva EV¹, Petrova NV², Marakhonov AV^{2,3}, Temnikov VE¹, Petrina NE², Amelina MA⁴, Vetrova NV⁵, Ponomareva TI¹, Zinchenko RA^{2,6} ✉

¹ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

² Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

⁴ Ivanovsky Biology and Biotechnology Academy, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

⁵ Regenerative and Genetic Medical Center Genetico, Moscow, Russia

⁶ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Ichthyosis vulgaris (IV), a serious skin condition that runs in families, is actively studied worldwide. In this work we aimed to evaluate the prevalence of IV and frequency of two *FLG* mutations R501X and 2282del4 in the population of the Rostov region. Our genetic epidemiology study of hereditary monogenic disorders covered a total of 497,460 residents of 12 districts to identify 230 separate nosological entities. In the course of the analysis, we calculated the prevalence of IV per district and in the entire region and compared our findings with the results of earlier studies. The average prevalence of IV in the Rostov region was 1:5,025, which is consistent with the average prevalence of the disease across Russia (1:5,151). Tselinsky and Millerovsky districts demonstrated the highest prevalence rates (1:1,942 and 1:2,032, respectively). To evaluate the frequency of two *FLG* mutations R501X and 2282del4, we assayed the samples of 58 patients with IV and 127 healthy unrelated controls by PCR followed by the restriction fragment length polymorphism analysis. In patients with IV, the frequency of the 2282del4 mutation was 48.28%, which is in line with European figures and also 30 times higher than in the controls (1.58%), suggesting the pathogenicity of the mutation. The R501X mutation was not identified both in patients with IV and healthy controls.

Keywords: ichthyosis vulgaris, mutations R501X and 2282del4, *FLG* gene, prevalence rates, Rostov region

Funding: this study was partially supported by the Russian Science Foundation (Grant 17-15-01051).

✉ **Correspondence should be addressed:** Rena Zinchenko
ul. Moskvorechie 1, Moscow, 115478; renazinchenko@mail.ru

Received: 17.11.2017 **Accepted:** 10.02.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.009

Вульгарный ихтиоз (OMIM #146700, *ichthyosis simplex*) — наиболее распространенная и относительно мягкая форма из всей группы наследственных несиндромальных ихтиозов. Клинические симптомы ВИ обычно появляются на втором месяце жизни и включают сухость и шелушение кожи, наличие мелкопластинчатых и/или отрубевидных чешуек светло-серого цвета, наиболее выраженных на животе, груди и разгибательных поверхностях конечностей, фолликулярный кератоз и гиперлинейность кожи ладоней и стоп [1, 2].

Заболевание обусловлено наличием мутаций в гене филаггрина (OMIM *135940, *filaggrin (FLG)*). Ген *FLG* локализуется в кластере генов комплекса эпидермальной дифференцировки на коротком плече 1-й хромосомы (1q21) и состоит из трех экзонов и двух интронов, за синтез белка отвечает третий экзон [2].

По результатам классического исследования, проведенного в Англии, показано, что частота всех форм ихтиоза составляет 1:3665, вульгарного ихтиоза — 1:5300, X-сцепленного — 1:6190 (мужского населения), аутосомно-рецессивных форм ихтиоза — 1:300 000. Вместе с тем отмечается, что фактическая частота значительно выше, так как было выявлено 24 больных аутосомно-доминантным ихтиозом из 6051 школьника и частота соответственно составила 1:250 [3].

Результаты проведенных в разных регионах Европы ДНК-исследований по изучению мутаций у больных ВИ показали, что частыми в гене *FLG* являются мутации R501X и 2282del4, их частота варьирует по данным разных авторов от 30,0% до 67,3% [4]. Показано незначительное колебание частот мутаций R501X и 2282del4 в гене *FLG* в ирландских (4,1% и 0,5% соответственно), шотландских (2,1% и 1,2%) и американских популяциях (2,4% и 1,1%) [5]. В то же время при обследовании шотландских школьников сообщалось о более высоких частотах мутаций R501X и 2282del4 (2,9% и 1,9% соответственно) [6]. По результатам исследования, проведенного в западной Австрии, частоты для каждой мутации составили 1,4% [7]. Возможно такая дифференциация обусловлена различными подходами к выявлению и обследованию пациентов.

В Юго-Восточной Азии молекулярно-генетическое обследование больных ВИ позволило описать другие мутации в гене *FLG*: 3321delA, S2554X, 441delA, 1249insG, 7945delA, Q2147X, E2422X и R4307X. Частота мутации 3321delA в гене *FLG* составила 52,31% у больных ВИ и 4% — в контрольной группе здоровых индивидов. Мутации, описанные в европейских популяциях, в Азии встречаются редко [8]. Аллельная гетерогенность в различных популяциях описана для многих наследственных заболеваний.

В России частота мутации 2282del4 в гене *FLG* в популяционной выборке Новосибирска составила 3,8% [9], в Республике Башкортостан гетерозиготными носителями мутации 2282del4 являлись 3,86% контрольной группы индивидов [10]. На Украине частота мутаций R501X и 2282del4 составила 2,1% и 1,0% соответственно [11].

В настоящее время принято считать, что вульгарный ихтиоз является заболеванием с неполным доминированием [1, 5]. Показано, что пациенты имели мягкие проявления вульгарного ихтиоза при гетерозиготном носительстве одной из мутаций в гене *FLG*, в то время как гомозиготные носители мутации R501X и компаунд-гетерозиготные носители R501X/2282del4 имели более тяжелые клинические симптомы заболевания [5]. Рядом авторов отмечено, что наличие мутаций в гене *FLG* имеет доза-зависимый эффект [6].

Целью настоящего исследования явилась оценка распространенности вульгарного ихтиоза и частоты мутаций R501X и 2282del4 в гене *FLG* у населения Ростовской области.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено генетико-эпидемиологическое исследование в 12 районах Ростовской области (Волгодонского, Дубовского, Егорлыкского, Зимовниковского, Красносулинского, Матвеево-Курганского, Миллеровского, Мясниковского, Родионово-Несветайского, Тарасовского, Целинского, Цимлянского). Численность обследованных составила 497 460 человек [12]. Обследование населения проведено по протоколу генетико-эпидемиологических исследований в период 2000–2017 гг. [13, 14]. Протокол генетико-эпидемиологических исследований разработан в ФГБНУ «МГНЦ» и применяется более 30 лет во всех исследованиях по данному направлению в РФ. Протокол включает тотальное обследование населения через медицинские учреждения региона, с последующим осмотром всех зарегистрированных пациентов врачами различного профиля (генетиком, педиатром, дерматологом, окулистом, невропатологом, психиатром и др.). В процессе экспедиционных полевых исследований при помощи протокола предусматривается выявление максимально возможного числа нозологических форм моногенной наследственной патологии (до 4000–5000).

Расчет распространенности ВИ проведен исходя из соотношения численности обследованных и числа больных. При проведении сравнительного анализа распространенности ВИ использованы данные генетико-эпидемиологических исследований ФГБНУ «МГНЦ» [13, 14]. Это обусловлено несопоставимостью данных литературы о распространенности ВИ в различных регионах вследствие существенных различий в методах получения материала.

Накопление ВИ в обследованных районах определено с использованием F-распределения (уровень значимости $\alpha < 0,001$) [15].

Молекулярно-генетическое исследование по выявлению мутаций R501X и 2282del4 в гене филаггрина *FLG* выполнено в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ».

С целью определения частоты мутаций 2282del4 и R501X в гене *FLG* обследовано две группы. Первая группа — больные с ВИ (58 пациентов), выявленные при проведении генетико-эпидемиологического исследования в 12 районах Ростовской области. Вторая группа (контрольная) представлена 127 здоровыми неродственными индивидами, которые на протяжении не менее трех поколений проживают на указанной территории: Миллеровского района (71 человек) и Волгодонского (56). При обследовании, все пациенты подписали письменное информированное согласие (в случае несовершеннолетних детей информированное согласие получено у их родителей): на добровольное участие в исследовании, на осмотр, забор биологического материала (кровь), публикацию в печати. У части семей (по просьбе больных) исследование проведено не для всех пораженных членов. Настоящее исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол №5 от 20.12.2010).

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови пациентов выполнено с использованием набора реактивов для выделения ДНК DNAPrep100 (DIAtom)

в соответствии с протоколом производителя. Для анализа мутаций (с.2282del4 и R501X) в гене *FLG* использован метод ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Сравнительный анализ частот мутаций среди больных и здоровых индивидов проведен при помощи точного критерия Фишера [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведения генетико-эпидемиологического исследования в 12 районах Ростовской области выявлено 230 нозологических форм моногенной наследственной патологии. В настоящей публикации анализируется распространенность и молекулярные причины одной из них — вульгарного ихтиоза. В общей совокупности выявлено 99 больных с ВИ из 49 ядерных семей.

Проведен расчет показателей распространенности ВИ для каждого района и по области в целом (табл. 1). Анализ показал, что наибольшее число больных ВИ зарегистрировано в Миллеровском (37) и в Целинском (20) районах, в то время как в Тарасовском, Родионово-Несветайском и Красносулинском районах больных не зарегистрировано.

Максимальные значения распространенности ВИ получены в Целинском (1:1942) и Миллеровском (1:2032)

районах. Значения распространенности ВИ в обследованных регионах Европейской части России приведены в табл. 2.

Как видно из представленных данных, показатель распространенности в области соответствует среднему значению по Европейской части России, равному 1:5151. Наименьшие значения распространенности выявлены в Брянской области 1:88 210, наибольшая распространенность отмечена в Республике Марий Эл и составляет 1:2130 [13, 14]. В Миллеровском и Целинском районах выявлено достоверное накопление ВИ (уровень значимости $\alpha < 0,001$) по сравнению со средними значениями как по Ростовской области, так и по России.

Из общего числа обследованных больных с ВИ 58 больных из 38 семей согласились принять участие в подтверждающей ДНК-диагностике. При обследовании у 28 больных подтверждено наличие мутации 2282del4 в гене *FLG* в гетерозиготном состоянии, что составило 48,28% от всех обследованных неродственных пациентов, мутация R501X не выявлена. При обследовании популяционной группы здоровых индивидов у двух человек обнаружена мутация 2282del4 в гене *FLG* в гетерозиготном состоянии, что составило 1,58%. Необходимо отметить, что мутация выявлена у здоровых индивидов, проживающих в Миллеровском районе. Мутация R501X также не выявлена.

Таблица 1. Распространенность вульгарного ихтиоза у населения в 12 районах Ростовской области

Название района	Численность населения	Число больных	Распространенность
Волгодонской	23 542	5	1:4708
Дубовский	23 185	4	1:5796
Егорлыкский	36 098	13	1:2777
Зимовниковский	38 071	2	1:19 036
Красносулинский	77 847	0	0
Матвеево-Курганский	37 600	11	1:3418
Миллеровский	75 201	37	1:2032
Мясниковский	37 432	5	1:7486
Родионово-Несветайский	30 760	0	0
Тарасовский	45 575	0	0
Целинский	38 830	20	1:1942
Цимлянский	33 319	2	1:16 660
Итого	497 460	99	1:5025

Таблица 2. Распространенность вульгарного ихтиоза в обследованных регионах европейской части РФ

Регион РФ: Область/край/Республика	Численность населения	Распространенность
Ростовская	497 460	1:5025
Архангельская	40 000	1:6667
Брянская	88 210	1:88 210
Кировская	286 616	1:3675
Костромская	444 476	1:8386
Тверская	76 000	1:12 667
Краснодарский	426 700	1:8534
Адыгея	101 800	1:5358
Башкортостан	250 000	1:6944
Марий Эл	276 900	1:2130
Татарстан	268 894	1:7469
Удмуртская	267 655	1:6225
Чувашская	264 490	1:3149
Россия (среднее)	2 791 741	1:5151

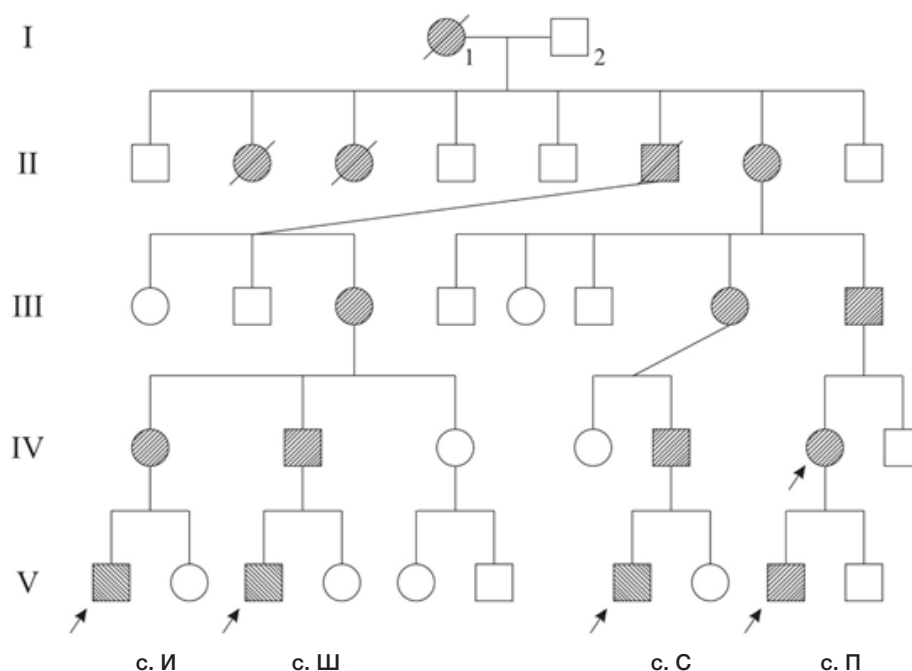


Рис. 1. Родословная семьи с вульгарным ихтиозом

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении клинко-эпидемиологического анализа отмечен выраженный полиморфизм клинических проявлений (от легких форм до тяжелых) не только между различными семьями, но и внутрисемейный. Заболевание у всех пациентов проявлялось с рождения. Отмечены сухость слизистых, кожных покровов и волос, «исчерченность» кожи ладоней и стоп. Отмечено шелушение кожи от редких до обширных поражений в виде мелкопластинчатых или крупнопластинчатых чешуек светло-серого цвета, локализованных у большинства пациентов на животе и голенях. У части пациентов наиболее выраженное шелушение наблюдалось на груди и разгибательных поверхностях конечностей, отмечен фолликулярный кератоз. Чешуйки распространялись также по краю роста волос, по границе красной каймы губ.

При анализе мест рождения и происхождения пациентов с ихтиозом, выявленных в Ростовской области отмечено, что около половины всех больных проживают в Миллеровском районе, либо родом оттуда (37 больных из 16 семей). По национальности все больные — русские, по происхождению — коренные жители района (коренными считали жителей и их семьи, проживающие на территории области не менее трех поколений). Истинное число больных ВИ в выявленных семьях составило 50 (4 умерло, 7 проживают за пределами района), т. е. прослеживается эффект основателя. Генеалогический анализ позволил установить родственные связи для части семей, так 5 из

16 семей (16 больных) родом (в третьем-четвертом поколении) из хутора Грай-Воронец и происходят от одного предка, родившегося в конце 19 в. (1896 г.). Родословная этих семей представлена на рис. 1.

Анализ показал, что частота мутаций 2282del4 в гене *FLG* ниже, чем в Европе, но соответствует результатам, полученным в Новосибирске [7, 9].

Выявлены различия в частоте мутации 2282del4 в гене *FLG* у больных ВИ — 0,483 (28/58) и в контрольной выборке — 0,016 (2/127), что подтверждает наличие значимых различий (значение точного критерия Фишера $p < 0,00001$).

ВЫВОДЫ

Распространенность ВИ в Ростовской области составила 1:5025 обследованных, с вариацией по районам от 0 (в Тарасовском, Родионово-Несветайском и Красносулинском) до 1:1942 в Целинском и в 1:2032 Миллеровском районах. Показатель распространенности ВИ у жителей данной территории соответствует среднему значению по России 1:5151 [13, 14]. Анализ происхождения пациентов показал, что для большей части семей в области прослеживается эффект основателя. Сравнительный анализ частоты мутации 2282del4 в гене *FLG* в двух группах показал, что среди пациентов с ВИ частота мутации (48,28%) 2282del4 в гене *FLG* в 30 раз превышает частоту в контрольной группе (1,58%), что косвенно подтверждает патогенное действие мутации в группе больных ВИ. Мутация R501X не выявлена как у больных ВИ, так и в контрольной группе.

Литература

- Oji V, Tadini G, Akiyama M, Blanchet Bardon C, Bodemer C, Bourrat E et al. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 63 (4): 607–41.
- Traupe H, Fischer J, Oji V. Nonsyndromic types of ichthyoses - an update. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014; 12 (2): 109–21.
- Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. *Br Med J*. 1966; 1 (5493): 947–50.

4. Oji V, Traupe H. Ichthyoses: differential diagnosis and molecular genetics. *Eur J Dermatol*. 2006; 16 (4): 349–59.
5. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*. 2006; 38 (3): 337–42.
6. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2006; 38 (4): 441–6.
7. Gruber R, Janecke AR, Fauth C, Utermann G, Fritsch PO, Schmuth M. Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15 (2): 179–84.
8. Meng L, Wang L, Tang H, Tang X, Jiang X, Zhao J et al. Filaggrin gene mutation c.3321delA is associated with various clinical features of atopic dermatitis in the Chinese Han population. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e98235.
9. Максимов В. Н., Куликов И. В., Семаев С. Е., Максимова Ю. В., Простякова Е. М., Малютин С. К. и др. Делеция 2282del4 в гене филаггрина в популяции жителей Новосибирска и у больных вульгарным ихтиозом. *Медицинская генетика*. 2007; 6 (8): 21–4.
10. Карунас А. С. Молекулярно-генетическое исследование аллергических заболеваний [диссертация]. Уфа: 2012.
11. Зуева М. И. Мутации R501X и 2282del4 гена FLG у больных аллергодерматозами. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія*. 2011; 947 (13): 93–7.
12. Амелина С. С., Ветрова Н. В., Пономарева Т. И., Амелина М. А., Ельчинова Г. И., Петрин А. Н. и др. Популяционная генетика наследственных болезней в 12 районах Ростовской области. *Нозологический спектр моногенных наследственных болезней*. Валеология. 2014; (2): 35–42.
13. Зинченко Р. А., Гинтер Е. К. Особенности медико-генетического консультирования в различных популяциях и этнических группах. *Медицинская генетика*. 2008; 7 (10): 20–9.
14. Зинченко Р. А., Ельчинова Г. И., Гинтер Е. К. Факторы, определяющие распространение наследственных болезней в российских популяциях. *Медицинская генетика*. 2009; 8 (12): 7–23.
15. Животовский Л. А. Популяционная биометрия. М.: Изд-во «Наука»; 1991. 271 с.

References

1. Oji V, Tadini G, Akiyama M, Blanchet Bardon C, Bodemer C, Bourrat E et al. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 63 (4): 607–41.
2. Traupe H, Fischer J, Oji V. Nonsyndromic types of ichthyoses - an update. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014; 12 (2): 109–21.
3. Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. *Br Med J*. 1966; 1 (5493): 947–50.
4. Oji V, Traupe H. Ichthyoses: differential diagnosis and molecular genetics. *Eur J Dermatol*. 2006; 16 (4): 349–59.
5. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*. 2006; 38 (3): 337–42.
6. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2006; 38 (4): 441–6.
7. Gruber R, Janecke AR, Fauth C, Utermann G, Fritsch PO, Schmuth M. Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15 (2): 179–84.
8. Meng L, Wang L, Tang H, Tang X, Jiang X, Zhao J et al. Filaggrin gene mutation c.3321delA is associated with various clinical features of atopic dermatitis in the Chinese Han population. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e98235.
9. Maksimov VN, Kulikov IV, Semaev SE, Maksimova YuV, Prostyakova EM, Malyutina SK et al. Deletsiya 2282del4 v gene filaggrina v populyatsii zhitel'ey No-vosibirskaya i u bol'nykh vul'garnym ikhtiozom. *Meditsinskaya genetika*. 2007; 6 (8): 21–4.
10. Karunas AS. Molekulyarno-geneticheskoe issledovanie allergicheskikh zabolevaniy [dissertatsiya]. Ufa: 2012.
11. Zueva MI. Mutatsii R501X i 2282del4 gena FLG u bol'nykh allergodermatozami. *Visnik Kharkivs'kogo natsional'nogo universitetu imeni V. N. Karazina. Seriya: Biologiya*. 2011; 947 (13): 93–7.
12. Amelina SS, Vetrova NV, Ponomareva TI, Amelina MA, El'chinova GI, Petrin AN et al. Populyatsionnaya genetika nasledstvennykh bolezney v 12 rayonakh Rostovskoy oblasti. *Nozologicheskii spektr monogennykh nasledstvennykh bolezney*. Valeologiya. 2014; (2): 35–42.
13. Zinchenko RA, Ginter EK. Osobennosti mediko-geneticheskogo konsultirovaniya v razlichnykh populyatsiyakh i etnicheskikh gruppakh. *Meditsinskaya genetika*. 2008; 7 (10): 20–9.
14. Zinchenko RA, El'chinova GI, Ginter E. K. Faktory, opredelyayushchie rasprostraneniye nasledstvennykh bolezney v rossiyskikh populyatsiyakh. *Meditsinskaya genetika*. 2009; 8 (12): 7–23.
15. Zhivotovskiy LA. Populyatsionnaya biometriya. M.: Izd-vo «Nauka»; 1991. 271 p.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НУММУЛЯРНОЙ ЭКЗЕМЫ

В. Ю. Уджуху, Н. М. Шарова , Н. Г. Короткий, Е. В. Давтян, С. В. Кукало

Кафедра дерматовенерологии, педиатрический факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Широкая распространенность, длительное хроническое течение заболевания и недостаточно изученный патогенез определяют интерес к проблеме нуммулярной экземы. Целью настоящего исследования было изучение особенностей клинического течения экземы, клинических критериев для постановки диагноза и определение роли нарушений основных систем врожденного и адаптивного иммунитета в развитии воспалительного процесса. С использованием высокочувствительного ИФА для определения цитокинового статуса, молекул адгезии и аффинности сывороточных антител обследован 51 больной нуммулярной экземой. Установлено, что у больных нуммулярной экземой наблюдались изменение соотношения выработки интерлейкинов с преобладанием провоспалительных вариантов, а также дисбаланс в системе иммунорегуляторных цитокинов. Обнаружен значительный рост относительного количества мононуклеарных клеток CD50⁺ и CD54⁺. Выявлены нарушения естественного антибактериального иммунитета, которые обусловлены продукцией низкоаффинных сывороточных антител. Проведенная работа позволила установить критерии дифференциальной диагностики нуммулярной экземы. Определены особенности нарушений со стороны иммунного гомеостаза, касающиеся как иммунорегуляторных, так и иммуноэффекторных звеньев. Обнаруженные нарушения в системе гуморальной регуляции иммунного ответа и состоянии неспецифической резистентности у больных нуммулярной экземой имеют патогенетическое значение и определяют особенности клинического течения данного заболевания.

Ключевые слова: нуммулярная экзема, клинические проявления, интерлейкины IL-10, IL-12 и IL-17, молекулы адгезии, аффинность антител, диагностические критерии, непрямая иммунофлюоресценция

 **Для корреспонденции:** Шарова Наталья Михайловна
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; nataliasharova@inbox.ru

Статья получена: 05.02.2018 **Статья принята к печати:** 16.02.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.006

CLINICAL MANIFESTATIONS AND IMMUNOLOGY OF NUMMULAR ECZEMA

Udzhukhu VYu, Sharova NM , Korotky NG, Davtyan EV, Kukalo SV

Department of Dermatology and Venereology, Faculty of Pediatrics,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Being a relatively common chronic skin condition with understudied pathogenesis, nummular eczema captures attention of medical researchers. The aim of this work was to describe clinical manifestations of the disease, revise criteria for its accurate diagnosis and understand the role of malfunctioning components of the adaptive and innate immunities in triggering the inflammatory response. Using high-sensitivity ELISA assays, we assessed the cytokine profiles, determined the levels of adhesion molecules and the affinity of serum antibodies in 51 patients with nummular eczema. The immune profiles of the patients were dominated by proinflammatory interleukins, being deficient in regulatory cytokines. The relative abundance of mononuclear CD50⁺ and CD54⁺ cells was increased. Natural antibacterial immunity was weakened by the production of low-affinity serum antibodies. Based on our findings, we have established criteria for the differential diagnosis of nummular eczema and described a contribution of both regulatory and effector immunity components to the abnormal immune homeostasis. We conclude that the discovered defects of the humoral regulation and non-specific resistance in patients with nummular eczema are pathogenic and determine the course of the disease.

Keywords: nummular eczema, clinical manifestations, interleukins, IL-10, IL-12, IL-17, proinflammatory cytokines, adhesion molecules, antibody affinity, diagnostic criteria, indirect immunofluorescence

 **Correspondence should be addressed:** Natalia Sharova
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; nataliasharova@inbox.ru

Received: 05.02.2018 **Accepted:** 16.02.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.006

Актуальность изучения экземы обусловлена широкой распространенностью заболевания, затяжным хроническим течением, частыми, длительно протекающими рецидивами, недостаточно изученным патогенезом и сложностями выбора эффективных лечебных мероприятий [1–3]. В настоящее время многими исследователями отмечается значительный рост заболеваемости одной из разновидностей экземы — нуммулярной экземой — на фоне нарастания резистентности к стандартным методам лечения. Согласно современным взглядам, экзема считается полиэтио-

логическим заболеванием, обусловленным воздействием многочисленных экзогенных и эндогенных факторов [4–6]. В возникновении экземы и хронизации воспалительного процесса определяющую роль играют эндокринные, обменные и нейрогуморальные нарушения, а также генетическая предрасположенность [7–9]. В ряде работ выявлены нарушения со стороны клеточного и гуморального звеньев иммунитета (угнетение иммунорегуляторного звена иммунитета, дефицит Т-супрессоров на фоне роста активности гуморального звена), что, по мнению авторов

этих исследований, имеет значение в развитии нуммулярной экземы и ее рецидивов [10–13].

Установлено также, что нуммулярная экзема нередко протекает с нарушением неспецифической резистентности и функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов, комплементарной системы, усилением процессов перекисного окисления липидов и компенсаторной активации антиоксидантной системы [14, 15]. Тем не менее, цитокиновый статус у больных нуммулярной экземой практически не изучен, а единичные работы [10], посвященные данному вопросу, не дают объективного представления о состоянии системы цитокинов и ее участии в развитии патологического процесса. В этой связи представлялось актуальным исследование цитокинов провоспалительного действия (IL-17), а также регуляторных интерлейкинов (IL-10, IL-12) у больных нуммулярной экземой.

Целью работы явилось определение особенностей клинического течения нуммулярной экземы, роли нарушений интерлейкинзависимой модуляции иммунного ответа и неспецифической резистентности в развитии данного дерматоза.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе филиала МНПЦДК Черемушкинский Департамента здравоохранения г. Москвы. Данное исследование было одобрено решением локального этического комитета ФГБОУ ВО РНИМУ им Н. И. Пирогова (протокол № 164 от 17.04.2017). От всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии включения пациентов в наблюдаемую группу: лица обоих полов старше 18 лет с клиническими проявлениями нуммулярной экземы с давностью заболевания более 6 месяцев на фоне отсутствия иммуносупрессивной терапии в течение последних 6 месяцев. Критерии исключения: тяжелые хронические заболевания, туберкулез, ВИЧ, сифилис, онкологические заболевания, добровольный отказ от участия в исследовании.

Под наблюдением находился 51 больной с нуммулярной экземой (23 мужчины и 28 женщин) в возрасте от 18 до 64 лет. Давность начала заболевания значительно варьировала и составляла в среднем $4,8 \pm 0,4$ года.

Первые клинические признаки нуммулярной экземы наиболее часто возникали у пациентов в возрастном интервале от 18 до 28 лет. Среди триггерных факторов наиболее часто определялись: воздействие бытовых раздражителей на кожу — у 10 (19,6%) человек, стресс — у 9 (17,6%) больных, нарушение диеты — у 6 (11,8%) пациентов. Микробная экзема выявлена у всех пациентов, причём у 44 (86,3%) больных микробная экзема носила хронический характер, часто рецидивируя. Количество рецидивов колебалось от 2 до 8 в год, а их длительность варьировала от 2–3 недель до 3-х месяцев. Клиническая картина нуммулярной экземы носила яркий, островоспалительный характер. У 21 (41,2%) пациента очаги поражения локализовались на коже верхних и нижних конечностей (тыльной стороне кистей, стоп, предплечий и голеней). У остальных пациентов (58,8%) экзematозный процесс поражал обширные участки кожных покровов, включая кожу спины, плеч, боковых поверхностей туловища и живота. Заболевание обычно начиналось с появления сильно зудящих небольших четко очерченных округлых эритематозного характера очагов, на фоне которых выявлялись миллиарные папулы, папуловезикулы, пустулы, корко-чешуйки. Значительно реже у больных нуммулярной экземой появлялись микро-

везикулы, сопровождающиеся образованием серозных «колодцев» и мокнущих.

При обследовании больных с помощью иммуноферментного анализа определяли уровень IL-10, IL-12 и IL-17 в сыворотке крови. Исследования проводили с помощью иммуноферментного комплекса, состоящего из вошера «Проплан» (Picon, Россия), шейкера «SkyLine» (ELMI, Латвия) и спектрофотометра «Униплан» (Picon, Россия). В качестве диагностических тест-систем использовали коммерческие наборы реагентов (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Иммунофенотипирование мононуклеарных клеток периферической крови проводили методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител серии ИКО. Определение относительной аффинности антител основывалось на применении различных молярных концентраций тиоцианата натрия, разрушающего связи комплекса антиген–антитело в твердофазном иммуноферментном анализе. Содержание растворимых антигенов sCD50 и sCD54 определяли иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител ИКО-60 и ИКО-184. Результаты выражались в условных единицах (У/мл). В качестве контроля использовали референсные значения, соответствующие среднестатистическим значениям лабораторных исследований, которые были установлены после обследования людей, не имеющих патологий. Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с помощью программы Microsoft Excel (Windows). Вычисляли средние арифметические значения (M), ошибки средних величин (m). Статистическую значимость различий оценивали по t -критерию Стьюдента. Различия значений считали статистически значимыми при вероятности более 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что у больных нуммулярной экземой в периферической крови достоверно повышены концентрации уровня IL-12 (до $159,8 \pm 5,9$ пг/мл) по сравнению с референсными значениями ($32,1 \pm 2,6$ пг/мл). У всех больных выявлялось повышенное содержание IL-17 (до $6,1 \pm 1,0$ пг/мл при референсных значениях $0,22 \pm 0,1$ пг/мл). Уровень IL-10 выражено снижен (до $4,1 \pm 0,18$ пг/мл при референсных значениях $14,1 \pm 0,2$ пг/мл) (см. таблицу). Уровень антигенов sCD50 и sCD54 ($196,5 \pm 4,6$ У/мл и $31,5 \pm 2,8$ У/мл) незначительно отличался от референсных значений. Вместе с тем, относительное количество мононуклеарных клеток CD50⁺ и CD54⁺ (соответственно $79,8 \pm 9,9\%$ и $81,8 \pm 10,8\%$) в сыворотке крови больных нуммулярной экземой оказалось достоверно выше нормы (соответственно $59,3 \pm 7,8\%$ и $60,2 \pm 7,9\%$). Анализ результатов проведенных иммунологических исследований выявил значительное снижение аффинности сывороточных антител к общей антигенной детерминанте у 26 (51,1%) пациентов с нуммулярной

Таблица 1. Содержание цитокинов в сыворотке крови больных нуммулярной экземой

	IL-10 (пг/мл)	IL-12 (пг/мл)	IL-17 (пг/мл)
Больные нуммулярной экземой (n = 38)	$4,1 \pm 0,18^*$	$159,8 \pm 5,9^*$	$6,1 \pm 1,0^*$
Референсные значения	$14,1 \pm 0,2$	$32,1 \pm 2,6$	$0,22 \pm 0,1$

Примечание: * $p < 0,01$ — достоверно по сравнению с контролем (референсными значениями).

экземой. Нормальные значения аффинности определялись у 25 (49,9%) пациентов, снижение в пределах 500–1000 усл. ед. наблюдалось у 16 (31,4%), ниже 500 усл. ед. — у 10 (19,7%) больных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время клиническая симптоматика нуммулярной экземы значительно изменилась, что повлекло за собой определенные сложности при постановке диагноза и его дифференциальной диагностике. В частности, отсутствует излюбленная локализация, патологический процесс часто носит инфильтративный характер, редко возникают экссудативные явления в виде везикулезных элементов и микроэрозий.

Проведенные иммунологические исследования показали, что возникновение и последующее течение нуммулярной экземы сопровождается характерными для островоспалительных реакций иммунологическими нарушениями. Однако, в отличие от данных литературы [2], касающихся нарушений продукции IL-1, IL-2 и IL-6, проведенные нами исследования позволили сформировать более объективное представление о направленности изменений в цитокиновой системе у больных нуммулярной экземой. В частности, нами впервые установлено многократное повышение содержания IL-12 и IL-17, указывающее на смещение дифференцировки лимфоцитов Th0 в сторону Th1, что, по всей видимости, приводит к усиленной продукцией провоспалительных интерлейкинов и развитию интенсивной воспалительной реакции в дермо-эпидермальном пространстве. В свою очередь, недостаток выработки IL-10 привел к функциональному нарушению регуляторного

звена иммунной системы и развитию патоморфологических изменений, определяющих клиническую симптоматику данного заболевания. Значительный подъем продукции низкоаффинных антител способствовал снижению активности комплементарной системы, опсонизации микробов и выведению бактериальных антигенов из организма. Вместе с тем, низкоаффинные антитела, связываясь с мембранными рецепторами иммунорегуляторных клеток, вызывали повышенную сенсibilизацию к микробным антигенам. Выявленный дисбаланс в системе антигенов адгезии, характеризующийся снижением растворимых молекул адгезии на фоне значительного роста мембранных форм данных антигенов, способствовал повышенной миграции клеток в очаг воспаления и хронизации воспалительного процесса.

ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований показали, что в настоящее время клиническое течение нуммулярной экземы сопровождается частым возникновением данного дерматоза в молодом возрасте, отсутствует излюбленная локализация воспалительного процесса и относительно редко отмечается появление таких экссудативных явлений, как микровезикулы, папуловезикулы, микроэрозии и мокнутие.

Проведенные лабораторные исследования показали роль дисбаланса уровня цитокинов и молекул адгезии в формировании иммунопатологических реакций при нуммулярной экземе. Выявленная тенденция к продукции низкоаффинных антител указывала на снижение резервов естественного антибактериального иммунитета.

Литература

- Оркин В. Ф., Олехнович Р. М. Микробная экзема (клиника, патогенез, лечение). *Дерматовенерология и косметология*. 2002; (2): 24–6.
- Poudel RR, Belbase B, Kafle NK. Nummular eczema. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2015; Jun 15; 5 (3): 27909. DOI: 10.3402/jchimp.v5.27909. eCollection.
- Абдрахимова Н. А., Надырченко Р. М., Мустафина Г. Р., Хисматуллина З. П., Захарченко В. Д. Эффективность традиционной терапии при микробной экземе. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2013; 8 (4): 27–9.
- Легессе Дорсисса Гобена, Прохоренков В. И. О патогенезе экземы (обзор литературы). *Сибирское медицинское обозрение*. 2003; (1): 65–7.
- Halberg M. Nummular eczema. *J Emerg Med*. 2012; 43 (5): 327–8.
- Iliev D, Niedner R. Diagnosis of eczema. Can you recognize what your patient's symptom? *MMW Fortschr Med*. 2001; Jun 14; 143 (24): 30–3. German.
- Brown SJ. Molecular mechanisms in atopic eczema: insights gained from genetic studies. *J Pathol*. 2017; 241 (2): 140–5.
- Каракаева А. В., Утц С. П. Роль нарушений эпидермального барьера в патогенезе экземы (обзор). *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2014; 10 (3): 525–30.
- Kim WJ, Ko HC, Kim MB, Kim DW, Kim JM, Kim BS. Features of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with nummular eczema. *Br J Dermatol*. 2013; Mar; 168 (3): 658–60. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2012.11072.x.
- Абдрахимова Н. А., Мустафина Г. Р., Хисматуллина З. Р., Захарченко В. Д. Иммунологическая концепция развития микробной экземы. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2014; 9 (1): 109–16.
- Абдрахимова Н. А., Надырченко Р. М., Мустафина Г. Р., Хисматуллина З. П. Сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов венозной крови и из очага воспаления при микробной экземе. *Практическая медицина*. 2013; 1–4 (73): 58–61.
- Järvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res*. 2003; Apr; 295 (1): 2–7. Epub 2003 Jan 31.
- Roberts H, Orchard D. Methotrexate is a safe and effective treatment for paediatric discoid (nummular) eczema: a case series of 25 children. *Australas J Dermatol*. 2010; May; 51 (2): 128–30. DOI: 10.1111/j.1440-0960.2010.00634.x.
- Нагоев Б. С., Нальчикова М. Т. Особенности перекисного окисления липидов у больных экземой. *Кубанский научно-медицинский вестник*. 2012; 4 (133): 74–5.
- Никонова И. В., Орлов Е. В., Коннов П. Е. Состояние биоценоза кожи при микробной экземе. *Практическая медицина*. 2011; 2 (49): 80–2.

References

- Orkin VF, Olekhovich RM. Mikrobnaya ekzema (klinika, patogenez, lecheniye). *Dermatovenerologiya i kosmetologiya*. 2002; (2): 24–6.
- Poudel RR, Belbase B, Kafle NK. Nummular eczema. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2015; Jun 15; 5 (3): 27909. DOI:10.3402/jchimp.v5.27909. eCollection.

3. Abdrahimova NA, Nadyrchenko RM, Mustafina GR, Hismatullina ZP, Zaharchenko VD. 'Effektivnost' traditsionnoj terapii pri mikrobnom `ekzeme. Meditsinskij vestnik Bashkortostana. 2013; 8 (4): 27–9.
4. Legesse Dorsissa Gobena, Prokhorenkov VI. On the pathogenesis of eczema (literature review). Siberian medical review. 2003, 1 (25): 65–7.
5. Halberg M. Nummular eczema. J Emerg Med. 2012; 43 (5): 327–8.
6. Iliev D, Niedner R. Diagnosis of eczema. Can you recognize what your patient's symptom? MMW Fortschr Med. 2001; Jun 14; 143 (24): 30–3. German.
7. Brown SJ. Molecular mechanisms in atopic eczema: insights gained from genetic studies. J Pathol. 2017; 241 (2): 140–5.
8. Karakaeva AV, Utts SP. Rol' narushenij `epidermal'nogo bar'era v patogeneze `ekzemy (obzor). Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal. 2014. 10 (3): 525–30.
9. Kim WJ, Ko HC, Kim MB, Kim DW, Kim JM, Kim BS. Features of Staphylococcus aureus colonization in patients with nummular eczema. Br J Dermatol. 2013 Mar; 168 (3): 658–60. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2012.11072.x.
10. Abdrahimova NA, Mustafina GR, Hismatullina ZR, Zaharchenko VD. Immunological concept of the development of microbial eczema. Medical journal of Bashkortostan. 2014, 9 (1): 109–16.
11. Abdrahimova NA, Nadyrchenko RM, Mustafina GR, Hismatullina ZP. Sravnitel'nyj analiz funktsional'noj aktivnosti nejtrofilov venoznoj krovi i iz ochaga vospalenija pri mikrobnom `ekzeme. Prakticheskaja meditsina. 2013; 1–4 (73): 58–61.
12. Järvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. Arch Dermatol Res. 2003; Apr; 295 (1): 2–7. Epub 2003 Jan 31.
13. Roberts H, Orchard D. Methotrexate is a safe and effective treatment for paediatric discoid (nummular) eczema: a case series of 25 children. Australas J Dermatol. 2010; May; 51 (2): 128–30. DOI: 10.1111/j.1440-0960.2010.00634.x.
14. Nagoev BS, Nal'chikova MT. Osobennosti perekisnogo okislenija lipidov u bol'nyh `ekzemoj. Kubanskij nauchno-meditsinskij vestnik. 2012; 4 (133): 74–5.
15. Nikonova IV, Orlov EV, Konnov PE. Sostojanie biotsenoza kozhi pri mikrobnom `ekzeme. Prakticheskaja meditsina. 2011; 2 (49): 80–2.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ТКАНЯХ ПЕРВИЧНЫХ И РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ЭНДОМЕТРИОДНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ЯИЧНИКОВ

Л. С. Булатова¹✉, А. А. Соломатина¹, Е. Н. Карева², Н. А. Коцюбинская²

¹ Кафедра акушерства и гинекологии, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова,

² Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

Для разработки индивидуального плана послеоперационного ведения пациенток необходим поиск молекулярно-фармакологического маркера принадлежности пациенток к группе риска рецидивирования эндометриоза яичников. Целью исследования было провести сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов эстрадиола (mER, ER_α, ER_β) и прогестерона (PGRmC₁, mPR, PR-A, PR-B) в ткани первичного эндометриоидного образования яичников и при рецидиве заболевания. В исследование вошли 94 пациентки репродуктивного возраста с эндометриоидными образованиями яичников: 82 пациентки с первичным эндометриозом и 12 с рецидивом заболевания. Для определения экспрессии генов стероидных рецепторов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). При рецидиве заболевания в эндометриоидной ткани яичника выявлен сдвиг спектра эстрогеновых рецепторов, а уровень рецепторов прогестерона оставался неизменным. Уровень экспрессии mER в ткани первичного эндометриоза составил $15,09 \pm 1,18$. Обнаружено увеличение экспрессии mER в 3 раза (с $15,09 \pm 1,18$ в первичной эндометриоидной ткани до $44,45 \pm 9,1$ в ткани с рецидивом эндометриоза), ER_β в 5 раз (с $11,71 \pm 0,22$ до $10,02 \pm 3,81$), а также снижение экспрессии рецептора ER_α в 7 раз (с $10,47 \pm 1,05$ до $1,68 \pm 0,55$) по сравнению с эндометриоидной тканью яичника при первичном заболевании ($p < 0,05$). Транскрипция рецепторов эндометриоидной ткани яичника зависит от стадии заболевания: при рецидивировании наблюдается изменение спектра рецепторов эстрадиола на фоне интактного рецепторного аппарата для прогестерона. Клиническое значение имеет сохранность чувствительности ткани к гестагенам как основа успешной противорецидивной гормональной терапии.

Ключевые слова: эндометриоз яичников, ПЦР, рецепторы эстрадиола, рецепторы прогестерона

✉ Для корреспонденции: Булатова Лолита Сайдалиевна
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; lolita.bulatova.87@mail.ru

Статья получена: 30.10.2017 Статья принята к печати: 13.04.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.014

EXPRESSION OF STEROID HORMONE RECEPTORS IN THE TISSUE OF ENDOMETRIOMAS IN FIRST-TIME AND RELAPSING PATIENTS

Bulatova LS¹✉, Solomatina AA¹, Kareva EN², Kotsyubinskaya NA²

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

A molecular marker for the risk of endometriosis recurrence can help to customize a post-operative treatment plan for an individual patient. The aim of this study was to compare the expression of genes coding for estradiol (mER, ER_α, ER_β) and progesterone (PGRmC₁, mPR, PR-A, PR-B) receptors in first-time and relapsing patients with ovarian endometriosis. Our study included 94 women of reproductive age with ovarian endometriosis: 82 first-time and 12 relapsing patients. The expression of genes coding for steroid receptors was measured using reverse transcription polymerase chain reaction. Recurrent conditions were characterized by a change in the expression of estrogen receptors and unchanged expression of progesterone receptors. Expression of mER in the tissue of patients with first-time endometriosis was 15.09 ± 1.18 . Patients undergoing recurrence demonstrated a 3-fold increase in mER expression (from 15.09 ± 1.18 to 44.45 ± 9.1). Also, in such patients ER_β expression was 5 times higher increasing from 11.71 ± 0.22 , which is an average value for first-time patients, to 10.02 ± 3.81 , while ER_α expression surged 7-fold from 10.47 ± 1.05 to 1.68 ± 0.55 ($p < 0.05$). Transcription of the studied receptors in the pathological tissue depended on the stage of the disease: in relapsing patients expression of estradiol receptors underwent some changes, while expression profile of progesterone receptors remained unchanged. Sensitivity of endometrial tissue to gestagens is clinically important and serves as a basis for a successful hormone-based relapse prevention.

Keywords: ovarian endometriosis, PCR, estradiol receptors, progesterone receptors

✉ Correspondence should be addressed: Lolita Bulatova
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; lolita.bulatova.87@mail.ru

Received: 30.10.2017 Accepted: 13.04.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.014

Эндометриоз — рецидивирующее доброкачественное гормонозависимое заболевание [1, 2]. Проблема эндометриоза приобретает все большее медико-социальное значение, что нередко связано с рецидивирующим течением заболевания и неблагоприятными последствиями для здоровья в целом, оказывающими негативное влияние на качество жизни и трудоспособность женщины. Частота рецидивов эндометриоза после хирургического лечения составляет 6,4% — через 2 года, 10% — через 3 года, 19,9% — через 5 лет и 30,9% спустя 6 лет [3]. Как в отечественной, так и в зарубежной литературе нет единого мнения о происхождении рецидивов заболевания, что вызывает трудности в выявлении биохимических маркеров эффективности лечения первичного и рецидивирующего эндометриоза яичников [4].

В литературе дискутируется вопрос, является рецидив эндометриоза яичников результатом неполного удаления эндометриоидной ткани при оперативном вмешательстве или это самостоятельно возникшее заболевание. Противорецидивное гормональное лечение может отразиться на рецепторном статусе эндометриоидной ткани, что способно повлиять на чувствительность очагов к дальнейшей гормональной терапии. Следовательно, транскрипция рецепторов стероидных гормонов в эндометриоидной ткани яичника может отличаться при первичном заболевании и его рецидиве. Целью работы было проведение сравнительного анализа экспрессии генов мембранных и ядерных рецепторов эстрадиола (mER , ER_{α} , ER_{β}) и прогестерона ($PGRMC1$, mPR , $PR-A$, $PR-B$) в ткани рецидивов по сравнению первичными эндометриоидными образованиями яичников. Сопоставление рецепторного профиля эндометриоидной ткани при первичном заболевании и рецидиве эндометриоза яичников позволит нам выявить целесообразность дальнейшего назначения гестагенов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Были обследованы 94 пациентки репродуктивного возраста: 82 с первичным эндометриозом яичников и 12 с рецидивирующими эндометриоидными образованиями. Перед включением в исследование у всех получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения для пациенток с первичным эндометриозом: репродуктивный возраст, эхографические признаки эндометриоидных образований яичников, лапароскопически и морфологически подтвержденный эндометриоз яичников.

Критерии включения для пациенток с рецидивом заболевания: репродуктивный возраст, наличие уже имевшихся хирургических вмешательств по поводу эндометриоза, эхографические признаки эндометриоидных образований яичников; лапароскопически и морфологически подтвержденный эндометриоз яичников.

Критерии исключения из исследования: пациентки с сопутствующей экстрагенитальной и генитальной патологией (миома матки, аденомиоз, опухоли яичников), пациентки после проведения гормональной терапии.

Все исследования выполняли в пролиферативную фазу менструального цикла.

С учетом верифицированного морфологического диагноза все наблюдаемые были разделены на две группы: I группу составили 82 пациентки с эндометриоидными образованиями яичников, II группу — 12 пациенток с рецидиви-

рующим эндометриозом. Возраст обследованных варьировал от 18 до 44 лет и составил в среднем $31,4 \pm 5,2$ года. Средний возраст наблюдаемых в I группе составил $34,2 \pm 5,3$ года с индивидуальными колебаниями от 22 до 41 года, во II группе — $33,4 \pm 6,9$ года, что свидетельствует о сопоставимости обследованных групп по возрасту. Длительность заболевания варьировала у больных I группы от 1,5 до 5 лет, у наблюдаемых II группы — от 2 месяцев до 1,5 лет. Наиболее часто пациентки с эндометриозом яичников предъявляли жалобы на боли в нижних отделах живота — в 35 (53,0%) случаях и в 6 (67,4%) случаях соответственно по группам.

Частота нарушений менструального цикла была достоверно ниже у пациенток в I группе в сравнении со II группой: 25,6% и 14,7% соответственно. В анамнезе у 35 (52,4%) обследованных из I группы и 4 (45,5%) обследованных из II группы отмечены беременности. Бесплодие выявлено у 8 (65,7%) пациенток с рецидивом заболевания и у 32 (25,9%) пациенток с первичным заболеванием. Доля пациенток с соматической патологией у обследованных больных обеих групп была практически одинаковой и составила 35,5 и 34,9% соответственно по группам.

Кроме общеклинического и гинекологического обследования нами выполнено ультразвуковое сканирование в режиме 2D с доплерометрией на аппарате VOLUSON-730 Expert (GEKretz, Zipf, Австрия) по стандартной методике с трансвагинальным датчиком (3,3–10,0 МГц). Всем обследованным проводили хирургическое вмешательство с использованием лапароскопического доступа с применением специального оборудования (Karl Storz, Германия). Выполняли гистологическое исследование эндометриоидной ткани, а также проводили исследование рецепторов стероидных гормонов.

В эндометриоидной ткани проводили исследование экспрессии генов: мембранного (mER) и ядерных (ER_{α} и ER_{β}) рецепторов эстрадиола, мембранных (mPR и $PGRMC-1$) и ядерных ($PR-A$ и $PR-B$) рецепторов прогестерона. Из биоптата ткани выделяли мПНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Получение кДНК на матрице мПНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции с использованием комплекта реагентов «РЕБЕРТА-L» («AmpliSens», Россия). Для ПЦР в реальном времени использовали набор готовых реактивов «Реакционная смесь 2,5× для проведения ОТ-ПЦР в присутствии SYBR Green I» на приборе iCycler iQ5 real-time PCR (BioRad, Германия). В качестве контрольного гена использовали гены GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) (табл.).

Для определения уровней экспрессии генов использовали формулы $0,5^{-\Delta Ct}$ (для выявления достоверных различий между группами данных) и $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (для выяснения кратности различий), где $\Delta Ct = Ct$ (искомого гена) — Ct (GAPDH) и $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (при первой патологии) — ΔCt (при второй патологии).

Все первичные экспериментальные данные обрабатывали с использованием программы GraphPadPrism 5.0. Анализ соответствия признака закону нормального распределения проводили с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение независимых переменных в двух выборках осуществляли непараметрическим методом с применением критерия Манна–Уитни. Критерием значимости при статистических расчетах в данной работе являлось значение показателя вероятности ошибки (p) не более 5%, т. е. $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эстрадиол и прогестерон являются главными регуляторами пролиферации репродуктивного тракта женщины, в первую очередь эндометрия и родственных ему тканей. Каждый стероидный гормон регулирует экспрессию сотен генов в течение разных фаз менструального цикла [5]. Результаты сравнения относительного количества мРНК рецепторов эстрадиола (mER, ER $_{\alpha}$, ER $_{\beta}$) и прогестерона (PGRmC1, mPR, PR-A, PR-B) в эндометриальной ткани яичника у пациенток с рецидивом и первичным заболеванием представлены на рис. 1.

Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов половых стероидов в ткани первичного эндометриоза яичников и ткани рецидива позволил выявить различие в экспрессии генов эстрадиола: увеличение экспрессии mER в 3 раза ($p = 0,0016$), ER $_{\beta}$ в 5 раз ($p = 0,0024$), а снижение экспрессии рецептора ER $_{\alpha}$ в 7 раз ($p = 0,0001$) в эндометриальной ткани при рецидиве по сравнению с первичным заболеванием.

ОБСУЖДЕНИЕ

Действие эстрогена или прогестерона опосредуется в первую очередь их ядерными рецепторами (ER и PR). Эстрадиол и прогестерон взаимодействуют с соответствующими рецепторами и активируют их в качестве факторов транскрипции. В отличие от ER и PR, мембранные рецепторы стероидов изучены недостаточно, однако известно, что они выполняют вспомогательную модулирующую роль по отношению к ядерным рецепторам [6].

Эстрадиол является ключевым гормоном роста и выживания эндометриальной ткани, а также воспаления и боли, связанных с ней. Эстрадиол, достигая ткани эндометриоза с кровью или продуцируясь локально, действует как стероидный гормон, регулирующий рост эндометриальной ткани. Подтипы рецептора ER (ER $_{\alpha}$ и ER $_{\beta}$) представляют собой белки с высоким сродством к эстрадиолу и кодируются отдельными генами. Хотя ER $_{\alpha}$ и ER $_{\beta}$ оба присутствуют в эндометрии, ER $_{\alpha}$, по-видимому, служит основным медиатором эстрогенного действия в этой ткани [7]. Увеличение количества ER $_{\alpha}$ связано с активацией пролиферации ткани-мишени, в то время, как ER $_{\beta}$ ограничивает транскрипционную активность ER $_{\alpha}$, т. е. оказывает антипролиферативный эффект [8, 9].

Эндометриальная ткань отличается уникальным профилем рецепторов стероидных гормонов по сравнению с эутопическим эндометрием. В литературных источниках имеются немногочисленные сообщения о значительно более высоких уровнях ER $_{\beta}$ и более низких уровнях ER $_{\alpha}$, тогда как уровни обеих изоформ PR, особенно PR-B, значительно ниже в ткани эндометриоза по сравнению с эутопическим эндометрием [10, 11]. Для количественного определения уровней мРНК ядерных рецепторов в первичных эндометриальных и эндометриальных стромальных клетках мы использовали ОТ-ПЦР. Уровни мРНК рецептора ER $_{\alpha}$ были значительно ниже (в 7 раз) в клетках стромы эндометриоза по сравнению со стромальными клетками эндометрия. Уровень мРНК рецептора ER $_{\beta}$ разительно выше (в ~34 раза) в эндометриальных стромальных клетках, в то же время отмечалось значительное снижение уровня мРНК рецептора ER $_{\beta}$ или его отсутствие в эндометриальных стромальных клетках. Содержание общего мРНК рецепторов PR и PR-B в эндометриальных стромальных клетках значительно ниже, чем в стромальных

клетках эндометрия [12]. В настоящее время имеются сообщения о повышении уровня PR-A при эндометриозе независимо от менструальной фазы [13]. Известно, что активация ER $_{\beta}$ приводит к транскрипции нескольких генов в стромальных клетках очагов эндометриоза, например SGK1-киназы, которая поддерживает выживаемость таких стромальных клеток очагов эндометриоза путем ингибирования проапоптотических факторов и способствует выживанию клеток путем фосфорилирования и инактивации белка FOXO3a [14].

В результате исследования, проведенного нами ранее, обнаружена повышенная экспрессия ядерного рецептора ER $_{\beta}$ в патологической ткани по сравнению с неизменной тканью яичника, что согласуется с литературными данными [14]. В эндометриальной ткани повышение уровня ER $_{\beta}$ подавляет экспрессию ER $_{\alpha}$, а увеличение отношения ER $_{\beta}$ к ER $_{\alpha}$ в эндометриальных стромальных клетках пропорционально связано с подавлением экспрессии рецепторов прогестерона и повышением уровня мРНК циклооксигеназы-2.

В нашем исследовании при определении стероидных рецепторов мы не делили эндометриальную ткань у пациенток с рецидивом на гистологические варианты. Подобные процессы могут приводить к развитию резистентности ткани к гестагенам и локальному воспалению [15]. В нашем исследовании на фоне сдвига эстроген-рецепторного профиля не выявлено изменения экспрессии генов рецепторов прогестерона (ни ядерных, ни мембранных).

Согласно результатам, полученным в нашем исследовании, уровень мРНК рецептора ER $_{\beta}$ (вероятно в связи с патологическим гипометилированием его промотора) значительно выше в эндометриальной ткани при рецидиве по сравнению с тканью при первичном эндометриозе. В то же время концентрация мРНК рецептора ER $_{\alpha}$ в ткани эндометриального образования у пациенток с рецидивом ниже. В исследовании не было получено сведений о достоверном снижении экспрессии генов рецепторов прогестерона на фоне сдвигов уровня рецепторов эстрадиола, следовательно, чувствительность рецидивирующей эндометриальной ткани яичника к экзогенным гестагенам не утрачена.

Таким образом, изменение экспрессии генов рецепторов эстрадиола в эндометриальной ткани у пациенток с рецидивом заболевания может быть отражением усугубления эстрогензависимых процессов в ткани при более активном процессе. Известно, что эндометриальная стромальная клетка содержит полный комплект генов стероидного каскада, достаточного для преобразования холестерина в эстрадиол [16]. Кроме того, эндометриальная

Таблица. Последовательность синтетических олигонуклеотидов для исследования экспрессии генов стероидных рецепторов и GAPDH методом ОТ-ПЦР [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/]

	Up	Low
GAPDH	gaa-ggt-gaa-ggt-cgg-agt	gaa-gat-ggt-gat-ggg-att-tcc
mER	agg-gac-aag-ctg-agg-ctg-ta	gtc-tac-acg-gca-ctg-ctg-aa
ER $_{\alpha}$	tgc-caa-gga-gac-tcg-cta-ct	ctg-gcg-ctt-gtg-ttt-caa-c
ER $_{\beta}$	tca-gct-tgt-gac-ctc-tgt-gg	tgt-atg-acc-tgc-tgc-tgg-ac
PR-A	aaa-tca-ttg-cca-ggt-ttt-cg	tac-agc-atc-tgc-cca-ctg-ac
PR-B	gac-tga-gct-gaa-ggc-aaa-gg	cga-aac-tcc-agg-caa-ggt-gt
mPR	tgc-cct-gct-gtg-tga-tct-ta	gat-agc-tga-ggc-tcc-tgg-at
PGRmC1	tgc-cct-gct-gtg-tga-tct-ta	gat-agc-tga-ggc-tcc-tgg-at

Примечание: GAPDH — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, mER — мембранный рецептор эстрадиола, ER $_{\alpha}$, ER $_{\beta}$ — ядерные рецепторы эстрадиола, PR-A, PR-B — ядерные рецепторы прогестерона, mPR, PGRmC1 — мембранные рецепторы прогестерона

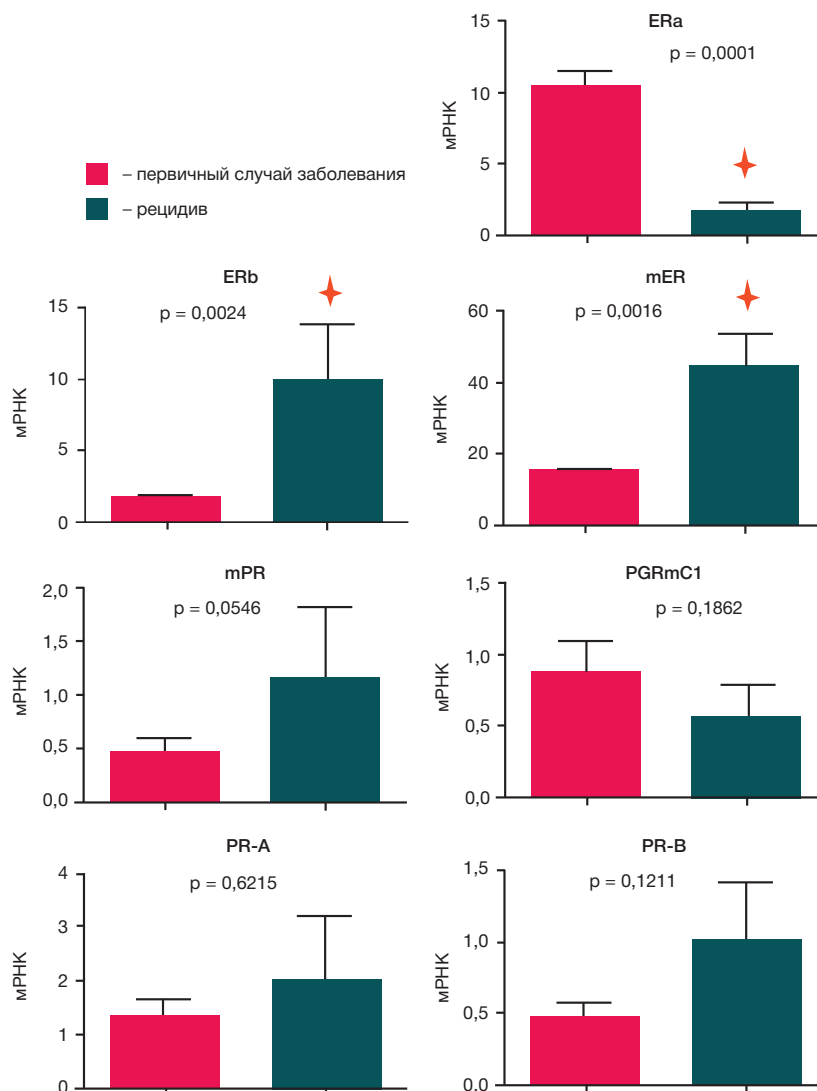


Рис 1. Уровни экспрессии генов рецепторов половых стероидов в эндометриоидной ткани яичника у пациенток с рецидивом эндометриоза и первичным заболеванием

Примечание: p — уровень достоверности (по Манну-Уитни); [mRNA] — экспрессия тестируемого гена по отношению к GAPDH ($0,5^{\Delta\Delta Ct} \cdot 100$)

ткань отличается aberrантной экспрессией ароматазы, в результате чего повышен локальный синтез эстрогенов, а также некоторых цитокинов и металлопротеиназ. Более того, дефицит в ткани 17β -гидроксистероиддегидрогеназы 2-го типа, переводящей 17β -эстрадиол в малоактивный эстрон, способствует накоплению активного эстрогена в ткани [17].

В более раннем нашем исследовании были получены данные по уровням экспрессии стероидных рецепторов в эндометриоидной ткани по сравнению с неизменной тканью яичника: экспрессия ER_{β} при эндометриозе яичников ($2,3 \pm 0,6$) достоверно выше ($p = 0,022$) в 2,4 раза, по сравнению с неизменной тканью яичника ($0,8 \pm 0,3$); экспрессия PR-A при эндометриозе яичников ($5,5 \pm 2,0$) достоверно выше ($p = 0,008$) в 9,7 раз, чем у неизменной ткани яичника ($1,3 \pm 1,3$); экспрессия PR-B при эндометриозе яичников ($0,7 \pm 0,2$) достоверно выше ($p = 0,005$) в 3,5 раза, чем у контрольной группы ($0,08 \pm 0,03$) [18].

Анализ рецепторного состояния ткани эндометриоза яичников при рецидиве свидетельствует о том, что на фоне изменения уровня mRNA всех рецепторов эстрадиола экспрессия генов рецептора прогестерона не изменилась, что является теоретическим обоснованием для дальней-

шего приема гестагенов с целью предотвращения возможного рецидива.

ВЫВОДЫ

Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов половых стероидов в ткани первичного эндометриоза яичников и ткани рецидива заболевания позволил выявить различия в экспрессии генов эстрадиола: увеличение уровней mRNA mER в 3 раза ($p = 0,0016$), ER_{β} — в 5 раз ($p = 0,0024$) и снижение экспрессии рецептора ER_{α} — в 7 раз ($p = 0,0001$) в ткани с рецидивом по сравнению с первичным заболеванием. Таким образом, рецепторное состояние эндометриоидной ткани при первичном заболевании и рецепторное состояние при рецидиве отличаются друг от друга по уровню mRNA рецепторов эстрадиола. Полученный результат исследования подтверждает участие рецепторов эстрадиола в качестве промоторов пролиферации гормонозависимых тканей репродуктивного тракта женщины. Отсутствие различий в экспрессии рецепторов прогестерона свидетельствует о неизменной чувствительности к гестагенотерапии эндометриоидной ткани при рецидиве заболевания.

Литература

- Leyland N, Casper R, Laberge Ph et al. Endometriosis: diagnosis and management. SOGC Clinical and practical guideline. J Obstet Gynaecol (Canada) 2010; 32 (7): 1–28.
- Баскаков В. П. Клиника и лечение эндометриоза. М.: Медицина; 1990. 238 с.
- Lee SY, Kim ML, Seong SJ, Bae JW, Cho YJ. Recurrence of Ovarian Endometrioma in Adolescents after Conservative, Laparoscopic Cyst Enucleation. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2017 Apr; 30 (2): 228–33.
- Стрыгина В. А., Соломатина А. А., Булатова Л. С., Садовникова Е. А., Хамзин И. З. Recurrence of ovarian endometriosis. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2015; 14 (6): 29–33.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. Endocrinology. 2002 Jun; 143 (6): 2119–38.
- Карева Е. Н., Шимановский Н. Л. Молекулярные механизмы действия гестагенов. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011; 74 (4): 36–42.
- Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. Annu Rev Physiol. 2005; 67: 285–308.
- Gustafsson JA. ER-beta scientific visions translate to clinical uses. Climacteric. 2006 Jun. 9 (3): 156–60.
- Сергеев П. В., Ткачева Н. Ю., Карева Е. Н., Высоцкий М. М. Прогестерон: рецепторный механизм действия в норме и при опухолевом росте. Акушерство и гинекология. 1994; 5: 6–8.
- Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. Mol Cell Endocrinol. 2006 Mar 27; 248 (1–2): 94–103.
- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Aug; 85 (8): 2897–902.
- Xue Q, Lin Z, Cheng YH, Huang CC, Marsh E, Yin P et al. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. Biol Reprod. 2007 Oct; 77 (4): 681–7.
- Bedaiwy MA, Dahoud W, Skomorovska-Prokvolit Y, Yi L, Liu JH, Falcone T et al. Abundance and localization of progesterone receptor isoforms in endometrium in women with and without endometriosis and in peritoneal and ovarian endometriotic implants. Reproductive Sciences. 2015; 22: 1153–61.
- Monsivais D, Dyson MT, Yin P, Navarro A, Coon JS, Pavone ME et al. Estrogen receptor β regulates endometriotic cell survival through SGK1 activation. Fertil Steril. 2016 May; 105 (5): 1266–73.
- Bulun SE, Monsivais D, Pavone ME, Dyson M, Qing Xue, Erkut Attar et al. Role of Estrogen Receptor- β in Endometriosis. Nat Med. 2012 Jul; 18 (7): 1016–18.
- Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. Pharmacol Rev. 2005 Sep; 57 (3): 359–83.
- Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. Journal of Molecular Endocrinology. 2000; 25: 35–42.
- Савельева Г. М., Соломатина А. А., Карева Е. Н., Булатова Л. С., Коцюбинская Н. А. Эндометриозные образования яичников: особенности экспрессии рецепторов стероидных гормонов в ткани. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2015; 14 (5): 5–9.

References

- Leyland N, Casper R, Laberge Ph et al. Endometriosis: diagnosis and management. SOGC Clinical and practical guideline. J Obstet Gynaecol (Canada) 2010; 32 (7): 1–28.
- Baskakov VP. Klinika i lechenie endometrioza. Moscow Publ Meditsina. 1990; 238 s.
- Lee SY, Kim ML, Seong SJ, Bae JW, Cho YJ. Recurrence of Ovarian Endometrioma in Adolescents after Conservative, Laparoscopic Cyst Enucleation. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2017 Apr; 30 (2): 228–33.
- Strygina VA, Solomatina A A, Bulatova LS, Sadovnikova EA, Khamzin IZ. Recurrence of ovarian endometriosis. Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2015; 14 (6): 29–33.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. Endocrinology. 2002 Jun; 143 (6): 2119–38.
- Kareva EN, Shimanovskii NL. Molekulyarnye mekhanizmy deistviya gestagenov. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2011; 74 (4): 36–42.
- Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. Annu Rev Physiol. 2005; 67: 285–308.
- Gustafsson JA. ER-beta scientific visions translate to clinical uses. Climacteric. 2006 Jun. 9 (3): 156–60.
- Sergeev PV, Tkacheva NYu, Kareva EN, Vysotskii MM. Progesteron: retseptorny mekhanizm deistviya v norme i pri opukholevom roste. Akusherstvo i ginekologiya. 1994; 5: 6–8.
- Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. Mol Cell Endocrinol. 2006 Mar 27; 248 (1–2): 94–103.
- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Aug; 85 (8): 2897–902.
- Xue Q, Lin Z, Cheng YH, Huang CC, Marsh E, Yin P et al. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. Biol Reprod. 2007 Oct; 77 (4): 681–7.
- Bedaiwy MA, Dahoud W, Skomorovska-Prokvolit Y, Yi L, Liu JH, Falcone T et al. Abundance and localization of progesterone receptor isoforms in endometrium in women with and without endometriosis and in peritoneal and ovarian endometriotic implants. Reproductive Sciences. 2015; 22: 1153–61.
- Monsivais D, Dyson MT, Yin P, Navarro A, Coon JS, Pavone ME et al. Estrogen receptor β regulates endometriotic cell survival through SGK1 activation. Fertil Steril. 2016 May; 105 (5): 1266–73.
- Bulun SE, Monsivais D, Pavone ME, Dyson M, Qing Xue, Erkut Attar et al. Role of Estrogen Receptor- β in Endometriosis. Nat Med. 2012 Jul; 18 (7): 1016–18.
- Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. Pharmacol Rev. 2005 Sep; 57 (3): 359–83.
- Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. Journal of Molecular Endocrinology. 2000; 25: 35–42.
- Saveleva GM, Solomatina AA, Kareva EN, Bulatova LS, Kotsyubinskaya NA. Endometrioidnye obrazovaniya yaichnikov: osobennosti ekspressii retseptorov steroidnykh gormonov v tkani. Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2015; 14 (5): 5–9.

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛОНАЛЬНОГО РЕПЕРТУАРА ФРАКЦИИ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТА С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ

Е. А. Комеч, Ю. Б. Лебедев, А. В. Кошенкова, Д. С. Сырко, Е. А. Мусаткина, С. А. Лукьянов, Д. М. Чудаков, И. В. Звягин ✉

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

Недавние исследования клонального репертуара Т-клеток при анкилозирующем спондилите (АС) позволили идентифицировать группу клонов Т-лимфоцитов с высокоомологичной структурой Т-клеточного рецептора, ассоциированных с развитием АС. Определение роли Т-лимфоцитов в развитии заболевания требует исследований клонального состава функционально различных субпопуляций Т-клеток больных АС. С использованием современной технологии реконструкции клонального репертуара Т-клеток на базе массированного параллельного секвенирования нами был впервые исследован клональный репертуар активированных Т-лимфоцитов периферической крови пациента с АС. Мы обнаружили высокое разнообразие клонального состава фракции Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации CD38 и HLA-DR, как по численности клеток, представляющих идентифицированные клонотипы, так и по структуре Т-клеточного рецептора клонотипов, что свидетельствует о разнообразной антигенной специфичности активированных Т-лимфоцитов периферической крови пациента. Основу клонального разнообразия составили малопредставленные в общем репертуаре клонотипы Т-клеток. В составе репертуара фракции был обнаружен ранее ассоциированный с АС и реактивным артритом клонотип TRBV9_CASSGVYSTDTQYF_TRBJ2-3, а также ряд других клонотипов субпопуляций цитотоксических и хелперных Т-клеток, вероятно, связанных с воспалительным процессом при АС. Экспрессия маркеров активации клетками ассоциированных с АС клонотипов демонстрирует активное участие таких клонов в воспалительной реакции при заболевании, определяя актуальность исследования их антигенной специфичности и роли в возникновении и/или развитии АС.

Ключевые слова: Т-клеточный репертуар, анкилозирующий спондилит, активированные Т-лимфоциты, болезнь Бехтерева, субпопуляция Т-лимфоцитов, клональный репертуар

Финансирование: работа поддержана Министерством образования и науки РФ, идентификатор проекта RFMEFI60716X0158.

Благодарности: авторы выражают признательность пациенту, принявшему участие в исследовании; врачу-гематологу, профессору кафедры гематологии и терапии им. А. А. Максимова Денису Анатольевичу Федоренко из Национального медико-хирургического центра имени Н. И. Пирогова — за консультации по клиническим вопросам; старшему научному сотруднику Елене Ивановне Коваленко из Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова за помощь в осуществлении цитофлуорометрического анализа.

✉ **Для корреспонденции:** Звягин Иван Владимирович
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; izvyagin@gmail.com

Статья получена: 15.12.2017 **Статья принята к печати:** 25.12.2017

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.001

A STUDY OF THE REPERTOIRE OF ACTIVATED T-CELL CLONES OBTAINED FROM A PATIENT WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Komech EA, Lebedev YB, Koshenkova AV, Syrko DS, Musatkina EA, Lukyanov SA, Chudakov DM, Zvyagin IV ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Recent studies of T-cell clonal repertoires of patients with ankylosing spondylitis (AS) have led to the discovery of AS-associated T-cell clones with a highly homologous T-cell receptor structure. The role of T-lymphocytes in the disease progression cannot be elucidated without analyzing the diversity and abundance of functionally different T-cell clones found in patient with AS. Using a state-of-the-art technique for T-cell repertoire profiling based on massively parallel sequencing, we, for the first time, studied the T-cell repertoire of activated T-cells from the peripheral blood of a patient with AS. We have demonstrated that a subpopulation of CD38⁺HLA-DR⁺ T-lymphocytes is highly diverse both in terms of clonal diversity and abundance of the identified clonotypes, suggesting diverse antigen specificity of the activated peripheral blood T-cells. Most of the activated T-cell clonotypes had low abundance in total population of peripheral blood T-cells. In the repertoire of activated T-cells we have found the clonotype TRBV9_CASSGVYSTDTQYF_TRBJ2-3, previously discovered in AS and reactive arthritis, and a few other clonotypes of cytotoxic and helper T-cells that may have a role in promoting inflammation in AS patients. Presence of the AS-associated clonotypes in activated T-cell subset suggests that the T-cells might play an active role in ongoing inflammation during the disease progression. This provides rationale for further research of their antigen specificity and role in triggering or maintaining AS.

Keywords: T-cell repertoire, ankylosing spondylitis, activated T lymphocytes, Bekhterev's disease, T-cell subpopulation, clonal repertoire

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Project ID RFMEFI60716X0158.

Acknowledgement: we are grateful to the patient who has kindly given his consent to participate in the study; to Denis Fedorenko, a hematologist and Professor of Maximov Hematology and Cell Therapy Department (Pirogov National Medical Surgical Center) for his consultations; Elena Kovalenko, a senior researcher at Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, for her assistance in conducting a flow cytometry analysis.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ivan Zvyagin
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; izvyagin@gmail.com

Received: 15.12.2017 **Accepted:** 25.12.2017

DOI: 10.24075/brsmu.2018.001

Анкилозирующий спондилит (АС, болезнь Бехтерева) — хроническое ревматологическое заболевание предположительно аутоиммунной природы. Согласно результатам исследований по поиску геномных ассоциаций, риск развития АС связан с определенными аллелями генов системы антиген-презентации (*HLA*, *ERAP1/2*), а также аллелями генов ряда рецепторов цитокинов, задействованных в провоспалительных реакциях [1]. Выраженная ассоциация риска развития АС с определенными аллелями гена *HLA-B*, одного из генов системы антиген-презентации, и наличие протективных вариантов *HLA-B* лежат в основе гипотезы возникновения АС в результате распознавания Т-клетками собственного антигена организма в комплексе с молекулой *HLA-B*27* [2]. Недавние исследования клонального репертуара Т-клеток больных АС позволили определить группу клонов цитотоксических Т-лимфоцитов с высокотопологической структурой антиген-распознающей части Т-клеточного рецептора (ТКР), специфически обнаруживающихся в периферической крови и синовиальной жидкости пораженных суставов больных АС [3, 4]. Клоны Т-лимфоцитов со сходной и/или идентичной структурой антиген-распознающей части ТКР ранее были найдены в синовиальной жидкости пациентов с реактивным артритом — заболеванием, которое также относится к группе спондилоартропатий [5–7].

Существенный интерес представляет характеристика функционального состояния клеток клонов Т-лимфоцитов, предположительно связанных с началом и/или поддержанием воспалительного процесса. В настоящей работе мы исследовали клональную структуру и состав фракции активированных Т-лимфоцитов периферической крови пациента с анкилозирующим спондилитом на фоне активного течения заболевания. Для реконструкции клонального репертуара Т-клеток пациента мы применили современную технологию, которая основана на секвенировании нового поколения (next-generation sequencing, NGS) библиотек кДНК бета-цепей ТКР, подготовленных с использованием техники молекулярного баркодирования [8, 9], и позволяет анализировать клональный состав образца и количественную представленность сотен тысяч отдельных клонов Т-клеток. После реконструкции клонального репертуара Т-лимфоцитов фракции активированных Т-клеток крови и исследования общей структуры репертуара мы провели поиск опубликованных к настоящему времени ассоциированных с АС клонов Т-клеток среди клонотипов исследуемой фракции. Для оценки представленности выявленных клонотипов в общем репертуаре периферической крови и их принадлежности к двум основным функциональным субпопуляциям Т-клеток также был реконструирован репертуар полной фракции и фракций $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-лимфоцитов периферической крови пациента.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациент

Пациент: мужчина 28 лет с диагнозом «центральная форма анкилозирующего спондилита (болезнь Бехтерева)», *HLA-B*27+*-генотип. Диагноз был установлен за 7 лет до получения образцов периферической крови. Терапия: нестероидные противовоспалительные препараты (аркоксиа), метотрексат, ингибитор фактора некроза опухоли α (препарат «Хумира»). За 3 года до сбора образцов крови была проведена высокодозная иммуносупрессивная терапия

(циклофосфан 200 мкг/кг + антитимоцитарный иммуноглобулин) с поддержкой аутологичными гемопоэтическими клетками (без обогащения по клеткам $CD34^{+}$ -субпопуляции). Через полгода после иммуносупрессивной терапии было зафиксировано первое обострение заболевания на фоне перенесенной ОРВИ. На момент получения образцов крови пациент также находился в состоянии обострения, проявлявшегося в выраженных болевых ощущениях и сниженной подвижности пораженных суставов.

Выделение лимфоцитарной фракции клеток и отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов

Периферическую кровь в объеме 8 мл собирали в вакуумные пробирки с КЗ-ЭДТА (Vacutainer, BD Biosciences, США). Мононуклеарную фракцию выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла ($1,077 \text{ г/см}^3$, «ПанЭко», Россия). В один момент времени (временная точка 1) были получены два образца периферической крови одинакового объема для реконструкции полного репертуара Т-лимфоцитов в двух независимых повторностях (образцы F1 и F2). Из отдельных образцов периферической крови были выделены фракции $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -клеток с помощью набора реактивов Dynabeads (Invitrogen, США) для позитивной иммуномагнитной селекции.

Для реконструкции клонального репертуара с помощью проточной цитофлуориметрии (FACS Vantage, BD Biosciences) из мононуклеарной фракции клеток крови были получены образцы клеток субпопуляции активированных Т-лимфоцитов периферической крови, определенной на основе экспрессии поверхностных маркеров дифференцировки $CD38$ и $HLA-DR$. В точке 1 была выделена субпопуляция лимфоцитов $CD3^{+}CD38^{+}HLA-DR^{+}$. Через два месяца (временная точка 2) из периферической крови пациента были получены образцы клеток субпопуляций $CD3^{+}CD8^{+}CD38^{+}HLA-DR^{+}$ и $CD3^{+}CD8^{-}CD38^{+}HLA-DR^{+}$. Для цитофлуориметрии использовались антитела $CD3-APC$ (Invitrogen), $CD8-FITC$ (Invitrogen), $HLA-DR-PerCP$ (Invitrogen) и $CD38-PE$ (IQProducts, Нидерланды) к поверхностным маркерам клеток человека. Окрашивание клеток антителами производили в соответствии с протоколами производителей. Клетки были собраны в 350 мкл буфера RLT (Qiagen, Нидерланды), после чего выделяли фракцию суммарной РНК.

Подготовка библиотек кДНК и секвенирование

Выделение РНК фракции мононуклеарных клеток периферической крови, а также фракций $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -клеток периферической крови проводили с использованием реагента TRIzol (Invitrogen) по инструкции производителя. Выделение РНК фракций Т-лимфоцитов, полученных методом проточной цитофлуориметрии, проводили с использованием набора реактивов RNeasy Mini (Qiagen) по протоколу производителя. Подготовку библиотек кДНК бета-цепи ТКР проводили по ранее описанному протоколу [10]. кДНК библиотеки секвенировали на платформе HiSeq 2000/2500 (Illumina, США) в режиме парного чтения с длиной прочтения 100 нт.

Обработка результатов секвенирования

Предварительная обработка результатов секвенирования включала коррекцию ошибок секвенирования и подсчет

числа уникальных молекул кДНК ТКР в библиотеке с помощью программного обеспечения MiGEC (на основе принципа молекулярного баркодирования) [8, 11]. Для определения V-, D- и J-сегментов, последовательности CDR3, подсчета численности клонотипов и формирования списка идентифицированных клонотипов для каждого образца использовали программное обеспечение MiXCR [12]. При восстановлении клонального репертуара образца использовали последовательности кДНК ТКР, прочитанные минимум дважды по результатам анализа последовательностей уникальных молекулярных меток (unique molecular identifier, UMI), что позволило устранить большую часть ошибочных последовательностей и существенно снизить искусственное разнообразие клонального репертуара [13]. Дальнейшую биоинформатическую обработку результатов проводили с помощью языка программирования R [14].

Ассоциацию обнаруженных клонотипов с тем или иным фенотипом Т-лимфоцитов осуществляли по совпадению нуклеотидной последовательности участка CDR3 и V-сегмента ТКР между репертуарами выделенных фракций Т-клеток.

Использованные опубликованные массивы секвенирования кДНК бета-цепей ТКР

В работе были использованы опубликованные данные, полученные при секвенировании репертуаров кДНК бета-цепей ТКР периферической крови и синовиальной жидкости HLA-B*27+ больных анкилозирующим спондилитом (данные доступны в публичной базе данных NCBI SRA по идентификатору SRP111372) [4]. Все использованные в работе опубликованные данные секвенирования были обработаны так же, как данные секвенирования, полученные для настоящей работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика исследованных образцов клеток и технологии реконструкции клонального репертуара

Для анализа клонального репертуара из периферической крови пациента с клинически установленным диагнозом «анкилозирующий спондилит» с помощью проточного цитофлуориметра были выделены 50 000 клеток, экспрессирующих маркеры CD3, CD38 и HLA-DR. На момент получения образцов крови состояние пациента характеризовалось выраженной болезненностью и ограниченной подвижностью пораженных суставов; антицитокиновая терапия не проводилась. По результатам цитофлуориметрии 2,6 % Т-лимфоцитов имели фенотип CD3+HLA-DR+, 1,5 % — CD3+CD38+HLA-DR+. Приведенные значения соответствовали опубликованным данным для периферической крови здоровых доноров того же возраста [15]. Повышенная представленность была отмечена для субпопуляции CD3+CD38+ Т-лимфоцитов: 39,2 % у пациента в сравнении с 5,8–24,6 % у здоровых доноров того же возраста.

В тот же момент времени из периферической крови донора были выделены клетки субпопуляций цитотоксических (CD4+) и хелперных (CD8+) Т-лимфоцитов, а также два образца клеток мононуклеарной фракции крови без дополнительного фракционирования (F1 и F2).

Для реконструкции клональных репертуаров бета-цепей Т-клеточного рецептора (ТКР) собранных образцов клеток мы применили оригинальную технологию, которая включала:

1) применение эффекта «смены матрицы» при синтезе кДНК, что позволяет использовать универсальные праймеры и исключить неравномерную амплификацию последовательностей ТКР, возникающую из-за различий в структуре входящего в состав зрелого гена ТКР вариабельного сегмента (V-сегмента);

2) применение технологии молекулярного баркодирования [8], что позволяет количественно оценить глубину анализа репертуара Т-лимфоцитов и представленность каждого клона Т-лимфоцитов в исследуемом образце [9], а также, в ходе предварительной обработки результатов секвенирования, скорректировать ошибки чтения и существенно снизить искусственное разнообразие клонального репертуара, возникающее в результате таких ошибок [11];

3) введение образец-специфических последовательностей (баркодов) на оба конца молекул кДНК библиотеки, одна из которых вводится на этапе синтеза кДНК [10], что позволяет практически полностью исключить кросс-контаминацию образцов как в процессе пробоподготовки, так и в процессе секвенирования. Низкая вероятность кросс-контаминации в свою очередь позволяет ассоциировать выявляемые клонотипы с определенным фенотипом Т-лимфоцитов, основываясь на идентификации уникальной нуклеотидной последовательности вариабельной части ТКР в образцах различных фракций Т-клеток (CD4+, CD8+, F1 и F2, CD3+CD38+HLA-DR+).

После подготовки и секвенирования соответствующих библиотек кДНК бета-цепей ТКР для собранных образцов клеток было получено 20,25 млн прочтений: 6,23 и 7,53 млн для образцов F1 и F2 соответственно, 2,78 млн — для CD4+, 2,96 млн — для CD8+ и 0,75 млн — для CD3+CD38+HLA-DR+-фракций Т-лимфоцитов. При дальнейшей обработке и реконструкции последовательностей вариабельной части бета-цепей ТКР (определении нуклеотидной последовательности CDR3 и V-сегмента — идентификации Т-клеточного клонотипа) использовали последовательности кДНК, прочитанные не менее двух раз, что позволяло дополнительно снизить искусственное разнообразие репертуара, возникающее из-за идентифицируемых в образце ошибочных клонотипов [13, 16].

Общая глубина анализа клонального репертуара Т-лимфоцитов периферической крови пациента составила около 1,6 млн уникальных клонотипов. Для образцов F1, F2, CD4 и CD8 было проанализировано 3,3 млн отдельных молекул кДНК бета-цепей ТКР (969 000, 1 260 000, 601 000 и 652 000 соответственно). В соответствии с ранее опубликованной оценкой эффективности использованной технологии реконструкции репертуара общая глубина анализа составила около 3,3 млн Т-клеток [13, 16]. Массив результатов секвенирования для фракции CD3+CD38+HLA-DR+ содержал 17 296 последовательностей кДНК бета-цепей ТКР, прочитанных минимум дважды, тогда как количество клеток фракции составило 50 000. Таким образом, в среднем, каждая последовательность кДНК ТКР, попавшая в анализ, представляла мРНК ТКР отдельного Т-лимфоцита, и общая глубина анализа фракции активированных Т-лимфоцитов составила около 17 000 Т-клеток.

Анализ представленности клонотипов фракции активированных Т-лимфоцитов в общем репертуаре Т-клеток

На первом этапе анализа клонального репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов мы исследовали распределение обнаруженных клонотипов в общем

Таблица 1. Сопоставление клонального состава фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов с образцами полного репертуара Т-клеток периферической крови

Ассоциированный фенотип*	Найдены в обеих репликах (образцы F1 и F2)**	Найдены только в одной из реплик (образец F1 или F2)**	Не обнаружены ни в одной из реплик***
CD4	505 (4,2 %)	148 (1,2 %)	119 (1 %)
CD8	282 (2,4 %)	29 (0,2 %)	32 (0,3 %)
Не определен	175 (1,5 %)	425 (3,6 %)	10212 (85,6 %)

Примечание. * — принадлежность к фракции цитотоксических или хелперных Т-клеток по результатам анализа репертуаров образцов CD8⁺ и CD4⁺; ** — в скобках указана доля от общего клонального разнообразия фракции; *** — число клонотипов, детектированных только во фракции CD3⁺CD38⁺DR⁺.

репертуаре Т-клеток периферической крови пациента. Более 85 % (10 212 из 11 927) клонотипов фракции активированных Т-клеток не были обнаружены ни в одном из репертуаров не фракционированных Т-клеток (F1 и F2) или фракций цитотоксических или хелперных Т-лимфоцитов (табл. 1). Вероятность обнаружения клонотипа в образце пропорциональна численности клона Т-лимфоцитов с таким ТКР в общем пуле Т-клеток периферической крови (т. е. представленности клонотипа в репертуаре). Высокое разнообразие и различная представленность клонов репертуара Т-клеток при сравнительно небольшом объеме исследуемого образца может объяснять значительную долю несовпадающих клонотипов между независимыми образцами Т-клеток, полученными в один момент времени.

Современная оценка теоретического разнообразия репертуара бета-цепей ТКР составляет порядка 10^8 вариантов [17], а диапазон представленности клонотипов в образцах полного репертуара, исследованных в нашей работе, составляет 1,5 % — $8,6 \times 10^{-6}$ % Т-клеток периферической крови. Чтобы определить, являлась ли наблюдаемая степень соответствия полному репертуару характерной именно для репертуара фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺, мы проанализировали степень совпадения клонального состава образцов полного репертуара (F1) и отдельных фракций Т-клеток, выделенных на основе экспрессии других поверхностных маркеров (CD4 и CD8), с образцом F2. При этом, для соответствия глубине анализа фракции активированных Т-лимфоцитов, репертуары образцов F1, CD4 и CD8 были восстановлены на основе соответствующего числа случайно отобранных *in silico* молекул кДНК ТКР (репертуары *F1, *CD4 и *CD8). После 100 независимых раундов такого анализа около 30 % клонотипов для каждого репертуара совпадали с клонотипами в образце F2 и представляли при этом 30–50 % от общего числа Т-клеток репертуаров *F1, *CD4 и *CD8. Соответствующие показатели для репертуара фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-клеток оказались в два раза ниже (рис. 1). Это свидетельствует о существенном обогащении фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов клонами Т-клеток, представленность которых в полном репертуаре недостаточна для обнаружения в идентичном по объему независимом образце Т-клеток.

Чуть более 1 500 клонотипов репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов (13,1 % от клонального разнообразия и около 20 % от числа проанализированных Т-клеток фракции) были обнаружены хотя бы в одном из двух независимых образцов не фракционированных Т-лимфоцитов периферической крови (F1 и F2) при достигнутой глубине анализа полного репертуара в 2 млн Т-клеток. Суммарно доля Т-клеток периферической крови, представленных такими клонотипами, составила 8,5 %. При этом лишь часть из них составляли клонотипы с относительно высокой представленностью в общем репертуаре Т-лимфоцитов пациента (рис. 2). Так, из 100 наиболее высокопредставленных в общем репертуаре клонотипов только 45 были обнаружены в репертуаре CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов (39 и 6 клонотипов фракций цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов соответственно).

Анализ степени совпадения клонального состава исследованных образцов показал, что основная часть фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов как по клональному разнообразию, так и по числу Т-клеток фракции была представлена клонами, имевшими низкую численность в общем пуле Т-лимфоцитов пациента. Низкая численность около 90 % клонотипов фракции обуславливает невозможность обнаружения таких клонотипов в образцах не фракционированных периферических Т-клеток при обычной глубине анализа в несколько миллионов отдельных Т-клеток периферической крови.

Структура клонального состава фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов

Полная структура варибельного домена бета-цепи ТКР целиком или в значительной степени определяет специфичность клона Т-лимфоцитов в отношении распознаваемого антигена в контексте определенной молекулы главного комплекса гистосовместимости (main histocompatibility complex, MHC) [18–20]. При анализе клонального репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов каждый клонотип был представлен как комбинация аминокислотной последовательности гиперварибельного участка CDR3 и идентификатора V-сегмента, входящего в состав зрелого

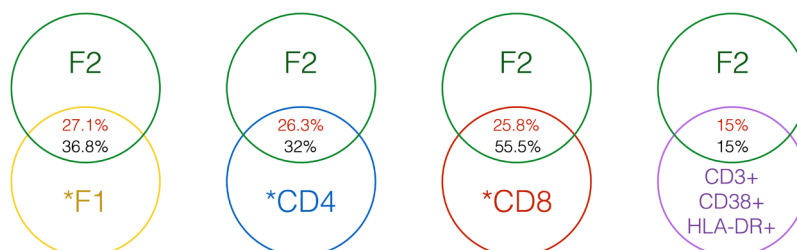


Рис. 1. Анализ сходства клонального состава различных фракций Т-лимфоцитов донора. Красным цветом указана доля клонального разнообразия, черным — доля репертуара Т-клеток, занимаемого клонотипами, совпадающими между сравниваемыми массивами. *F1, *CD4, *CD8 — репертуары образцов F1, CD4, CD8, восстановленные на основе 17 523 случайно отобранных *in silico* молекул кДНК ТКР, что равно числу молекул кДНК ТКР, попавших в анализ для образца фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺

гена ТКР и определяющего структуру остальной части вариабельного домена бета-цепи.

Клональный репертуар фракции активированных Т-лимфоцитов пациента характеризовался высоким относительным разнообразием, сопоставимым с разнообразием полного репертуара. В соответствии с результатами секвенирования практически каждая Т-клетка фракции, попавшая в анализ, представляла уникальный вариант вариабельного домена бета-цепи ТКР: из 17 000 отдельных молекул кДНК ТКР было восстановлено порядка 12 000 отдельных клонотипов. Для сравнения: в каждом из образцов тотальной фракции Т-лимфоцитов (F1 и F2) из 1 млн последовательностей отдельных молекул кДНК ТКР было идентифицировано около 550 000 отдельных клонотипов.

Распределение представленности клонотипов фракции $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ также совпадало с распределением полного репертуара Т-клеток (образец F1). Наиболее высокопредставленный клонотип фракции занимал 0,27 % от общего числа Т-лимфоцитов. Для сравнения: наиболее высокопредставленный клонотип полного репертуара (F1) представлял 1,6 % Т-клеток репертуара. На 100 наиболее высокопредставленных клонотипов образцов $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ и F1 пришлось 5,6 и 9 % Т-клеток репертуара соответственно. Также не было обнаружено существенных различий между образцами F1 и $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ в распределении представленности групп клонотипов, в состав бета-цепи ТКР которых входит определенный V-сегмент и которые, таким образом, представляют собой клонотипы, предположительно распознающие пептиды в комплексе со сходными молекулами МНС. Полученные результаты демонстрируют отсутствие во фракции активированных Т-клеток периферической крови пациента значительного по сравнению с полным репертуаром обогащения клонотипами с определенной структурой вариабельного домена бета-цепи ТКР.

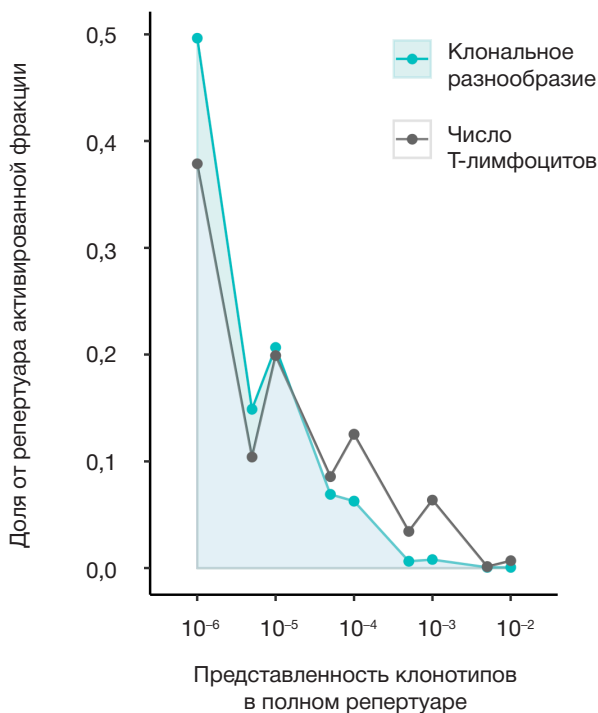


Рис. 2. Распределение доли клонотипов, идентифицированных во фракции $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ Т-клеток, в зависимости от представленности клонотипа в полном репертуаре (F1). Ось Y — доля клонотипов фракции от общего числа клонотипов фракции, ось X — представленность клонотипа в полном репертуаре Т-клеток

Поиск клонотипов, ассоциированных с развитием анкилозирующего спондилита

Непосредственное участие в иммунном ответе клеток, экспрессирующих маркеры Т-клеточной активации, позволяет предполагать обогащение репертуара активированной фракции клонотипами, которые связаны с развитием воспаления в период обострения АС. Для характеристики репертуара Т-клеток фракции $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ мы провели поиск ассоциированных с АС клонотипов, обнаруженных ранее в периферической крови и синовиальной жидкости $HLA-B^*27$ -положительных пациентов [3, 4]. В массив для поиска были также добавлены клонотипы, обнаруженные в синовиальной жидкости (СЖ) минимум двух из трех $HLA-B^*27$ -позитивных пациентов, репертуары которых были исследованы нами ранее [4]. Такое ограничение было принято для снижения эффекта случайного совпадения нерелевантных клонотипов между двумя донорами и, таким образом, поиска клонотипов, специфически присутствующих в месте воспаления у разных доноров. Массив для поиска включал 1 913 клонотипов: 11 последовательностей CDR3, составляющих мотив, ассоциированный с АС по результатам двух упомянутых работ, а также 1 902 клонотипа, найденных в синовиальной жидкости больных АС.

Среди 11 927 клонотипов репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов мы обнаружили 32 полных совпадения аминокислотной последовательности вариабельного домена бета-цепи ТКР с клонотипами из списка. Большинство совпавших между массивами клонотипов являлись сравнительно низкопредставленными во фракции $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ Т-клеток (рис. 3).

Восемь из этих 32 клонотипов не были обнаружены в репертуарах Т-клеток периферической крови $HLA-B^*27$ -позитивных здоровых доноров (данные из [4]) (табл. 2), что

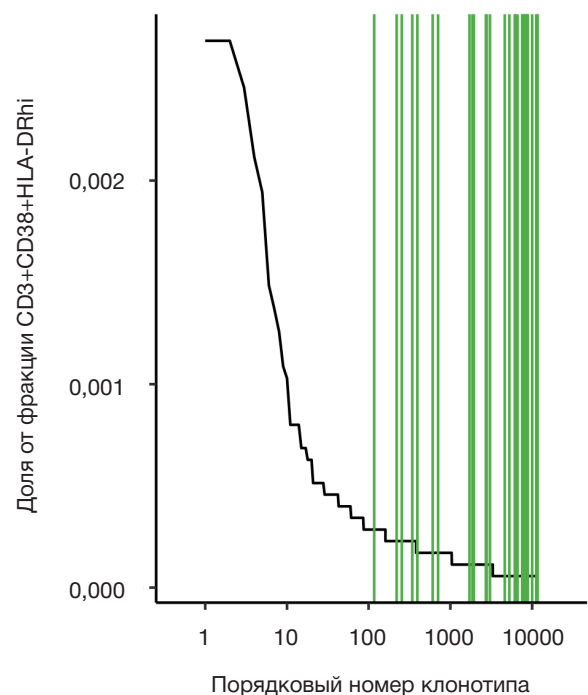


Рис. 3. Представленность клонотипов из группы ассоциированных с АС и обнаруженных в синовиальной жидкости больных АС в репертуаре фракции активированных Т-клеток пациента. Ранг (порядковый номер) каждого из клонотипов списка (см. пояснения в тексте статьи), обнаруженных в репертуаре фракции, обозначен вертикальными линиями

предполагает отсутствие экспансий таких клонотипов у здоровых доноров [4, 21, 22]. Один из этих 8 клонотипов, TRBV9_CASSVGYYSTDTQYF_TRBJ2-3, входит в состав 11 вариантов последовательностей варибельной части ТКР, составляющих ассоциированный с АС мотив CDR3 бета-цепи ТКР, обнаруженный ранее также в синовиальной жидкости у *HLA-B*27*-позитивных пациентов с реактивным артритом [5, 23]. Как и во всех трех ранее опубликованных случаях обнаружения данного клонотипа в образцах пациентов со спондилоартропатиями (АС, реактивный артрит (РеА)), в настоящей работе данный клонотип также был ассоциирован с субпопуляцией CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Через 2 месяца, на протяжении которых состояние пациента не изменилось, мы провели повторный анализ клонального репертуара Т-лимфоцитов активированной фракции (временная точка 2). С помощью проточной цитофлуориметрии были собраны 16 000 и 10 500 клеток фракций CD3⁺CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ периферической крови, для которых было восстановлено 3 900 и 8 300 клонотипов бета-цепей ТКР соответственно. При сходной по числу выявленных клонотипов глубине анализа репертуара фракции активированных Т-клеток между двумя временными точками совпало около 3 % клонотипов, представлявших Т-лимфоциты цитотоксической и хелперной субпопуляций в равной пропорции: из 323 клонотипов, попавших в репертуар активированных Т-клеток в обеих временных точках, 154 были ассоциированы с фенотипом CD8⁺, 136 — с CD4⁺ и для 33 фенотип не был определен.

В составе репертуара фракций CD8⁺ активированных Т-лимфоцитов во второй временной точке вновь был обнаружен клонотип TRBV9_CASSVGYYSTDTQYF_TRBJ2-3, а также еще 3 клонотипа, обнаруженные ранее в синовиальной жидкости больных АС и не найденные в образцах периферической крови здоровых *HLA-B*27*-позитивных доноров (табл. 2). Аминокислотная последовательность варибельного домена бета-цепи ТКР еще одного из обнаруженных в точке 2 клонотипов имела сравнительно высокую степень гомологии с опубликованными АС-ассоциированными клонотипами за счет идентичного V-сегмента в составе гена ТКР и сходной последовательности гиперварибельного участка CDR3. Данный клонотип был обнаружен в репертуаре периферической крови 40 % больных

АС (n = 25) [4] и двух из трех исследованных репертуаров Т-клеток синовиальной жидкости, но не был обнаружен ни в одном из образцов крови *HLA-B*27*-позитивных здоровых доноров (n = 7) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поверхностные маркеры CD38 и HLA-DR позволяют выделить субпопуляцию Т-клеток, определяемых как активированные Т-лимфоциты и осуществляющих эффекторные функции при реализации иммунного ответа, например в ходе противовирусного ответа [24–27]. Повышенное число CD38⁺HLA-DR⁺-Т-клеток в периферической крови показано у пациентов с аутоиммунными воспалительными заболеваниями кишечника, которые часто регистрируют при различных спондилоартропатиях, включая анкилозирующий спондилит [28]. В недавнем исследовании эффекта антицитокиновой терапии было показано повышенное содержание цитотоксических HLA-DR⁺-Т-клеток в периферической крови больных АС по сравнению со здоровыми донорами, а также значимые различия по количеству HLA-DR⁺ хелперных Т-клеток между пациентами, для которых терапия оказалась эффективной и неэффективной [29]. Обнаружение группы клонов Т-клеток с высокгомологичной структурой ТКР, ассоциированных с АС [3, 4], определяет необходимость изучения клонального состава функционально различных субпопуляций Т-клеток при АС для выявления роли Т-лимфоцитов в развитии заболевания. В данной работе, используя одну из самых современных технологий подготовки библиотек кДНК и анализа данных секвенирования, мы впервые исследовали структуру и клональный состав репертуара субпопуляции активированных Т-лимфоцитов периферической крови при АС. Важными для данного исследования особенностями метода являются низкая вероятность искажений клонального состава и возможность количественной оценки представленности каждого выявленного клонотипа в образце.

Анализ представленности клонотипов фракции активированных Т-клеток в полном репертуаре Т-лимфоцитов периферической крови показал уникальность клонального состава фракции: субпопуляция активированных Т-лимфоцитов обогащена клонотипами, не попадающими в

Таблица 2. Анализ встречаемости клонотипов фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов периферической крови пациента в образцах периферической крови и синовиальной жидкости (СЖ) пациентов с АС*

Аминокислотная последовательность	V-сегмент	Частота встречаемости в образцах пациентов с АС** (n = 25), %	Число образцов СЖ (n = 3)	Ассоциированный фенотип***	Образец
CASSLGPQSYEQYF	TRBV5-1	32,0 (8)**	3	CD4	Точка 1
CASSVGYYSTDTQYF	TRBV9	24,0 (6)	1	CD8	Точки 1 и 2 (CD8 ⁺)
CASSSRGPYEQYF	TRBV7-2	16,0 (4)	2	–	Точка 1
CASSDYNEQFF	TRBV2	16,0 (4)	2	CD4	Точка 1
CASSQEGQESDTQYF	TRBV4-2	12,0 (3)	2	–	Точка 1
CASSLGRNNEQFF	TRBV5-1	4,0 (1)	2	–	Точка 1
CAWSLGVNQPHF	TRBV30	4,0 (1)	2	–	Точка 1
CASSYSGSGYTF	TRBV6-5	0 (0)	2	CD4	Точка 1
CASSVGDDYGYTF	TRBV9	40,0 (10)	2	CD8	Точка 2 (CD8 ⁺)
CASSLGLSGANVLT	TRBV5-6	8,0 (2)	2	–	Точка 2 (CD8 ⁺)
CASSQAGAYQETQYF	TRBV4-2	0 (0)	2	–	Точка 2 (CD8 ⁺)

Примечание. * — в список включены клонотипы фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов периферической крови пациента, не обнаруженные в образцах крови здоровых *HLA-B*27*-положительных доноров; ** — в скобках указано число образцов периферической крови пациентов, в которых был обнаружен клонотип; *** — принадлежность к фракции цитотоксических или хелперных Т-клеток по результатам анализа репертуаров образцов CD8⁺ и CD4⁺.

анализ при исследовании не фракционированных образцов или отдельных субпопуляций CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток периферической крови вследствие низкой численности клеток таких клонотипов. Значительная степень несовпадения клонального репертуара Т-клеток активированной фракции при сравнительном анализе образцов в двух временных точках, по-видимому, также является следствием малой представленности клонотипов фракции.

Низкая численность большинства клонотипов активированной фракции Т-клеток может быть связана с обогащением клетками, участвующими в воспалительной реакции и локализующимися, в большей степени, в очагах воспаления. Повышенная численность клеток АС-ассоциированных клонов в синовиальной жидкости по сравнению с периферической кровью при остром синовите у больных АС показана в недавней работе Komoch и соавт. [4]. Вместе с тем при достигнутой глубине анализа разнообразия клонального состава фракции практически совпадает с разнообразием полного репертуара Т-лимфоцитов периферической крови. Исследуя репертуар фракции, мы также не обнаружили выраженных клональных экспансий или обогащения клонотипами с определенной структурой варибельного домена бета-цепи ТКР по сравнению с полным репертуаром. С использованием недавно созданной базы данных клонотипов с охарактеризованной специфичностью к различным комплексам МНС–пептид [30] среди клонотипов активированной фракции было обнаружено несколько совпадений аминокислотной последовательности бета-цепи ТКР с клонотипами, специфичными к иммуногенным пептидам вирусов гриппа, CMV и EBV. Можно заключить, что обнаруженные в периферической крови пациента с АС Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры активации HLA-DR и CD38, представляют фракцию активно участвующих в иммунном ответе Т-клеток, специфичных к широкому кругу антигенов.

Для поиска клонотипов, связанных с АС, мы использовали данные о составе клонального репертуара Т-клеток периферической крови и синовиальной жидкости больных АС и периферической крови здоровых *HLA-B*27*⁺-позитивных доноров, полученные ранее с использованием той же технологии реконструкции Т-клеточного репертуара. После анализа репертуаров двух полученных в разное время и с помощью разных стратегий цитофлуориметрии образцов Т-клеток, экспрессирующих маркеры активации, нами были найдены 11 клонотипов, не обнаруженные ни в одном из репертуаров здоровых доноров и при этом идентифицированные в синовиальной жидкости минимум двух больных АС. Девять из них были обнаружены также и в репертуарах периферической крови больных. Идентификация данных клонотипов в репертуарах *HLA-B*27*⁺-пациентов с АС и отсутствие их у здоровых *HLA-B*27*⁺-доноров демонстрирует способность прохождения такими клонотипами селекции в тимусе при наличии *HLA-B*27*, с последующей клональной экспансией у пациентов, и отсутствие соответствующих клональных экспансий у здоровых *HLA-B*27*⁺-индивидов [21].

Среди указанных 11 последовательностей варибельного домена бета-цепи ТКР был обнаружен клонотип TRBV9_CASSVGGVYSTDTQYF_TRBJ2-3, ассоциированный с АС по результатам недавних работ по анализу клонального репертуара Т-клеток периферической крови [3] и си-

новиальной жидкости [4] больных АС. Ранее идентичный клонотип бета-цепи ТКР был обнаружен в синовиальной жидкости *HLA-B*27*⁺-пациентов с реактивным артритом [5, 23]. Как и в настоящей работе, во всех процитированных исследованиях данный клонотип ассоциирован с субпопуляцией цитотоксических Т-лимфоцитов. Проанализировав клональный репертуар двух независимых образцов фракции активированных Т-лимфоцитов периферической крови, полученных с разницей в 2 месяца с использованием разных стратегий выделения клеточных субпопуляций, нам удалось показать длительное присутствие Т-клеток данного клонотипа в активированном состоянии в периферической крови пациента.

Также в составе фракции цитотоксических активированных Т-лимфоцитов нами был обнаружен клонотип TRBV9_CASSVGGDYGYTF_TRBJ1-2, найденный в образцах периферической крови 40 % больных (n = 25) и двух образцах синовиальной жидкости пациентов (n = 3). Высокая частота обнаружения в крови и синовиальной жидкости больных АС, определенная степень гомологии структуры варибельного домена бета-цепи ТКР данного клонотипа с другими, ранее обнаруженными у больных РеА и АС клонотипами, и отсутствие в образцах периферической крови здоровых *HLA-B*27*⁺-доноров позволяют предположить возможную связь данного клонотипа с воспалительными процессами при анкилозирующем спондилите. Кроме того, по-видимому, некоторые клонотипы фракции хелперных Т-клеток, также могут быть связаны с АС, о чем говорит обнаружение в репертуаре активированных Т-клеток нескольких CD4⁺-клонотипов с совпадающей структурой варибельного домена бета-цепи ТКР с клонотипами CD4⁺-фракций Т-клеток синовиальной жидкости больных АС и не обнаруженных в периферической крови здоровых *HLA-B*27*⁺-доноров.

ВЫВОДЫ

В нашем исследовании впервые изучен клональный состав фракции Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации HLA-DR и CD38, периферической крови пациента с анкилозирующим спондилитом. Показано обогащение фракции малочисленными в общем репертуаре Т-клеток клонотипами и отсутствие выраженной олигоклональности субпопуляции на фоне активной стадии заболевания. В составе репертуара фракции обнаружен ряд клонотипов субпопуляций цитотоксических и хелперных Т-клеток, вероятно, связанных с воспалительной реакцией при АС. Наиболее значительным результатом, по мнению авторов, является обнаружение в субпопуляции активированных цитотоксических Т-лимфоцитов крови клонотипа, ассоциированного с АС по результатам более ранних исследований. Экспрессия маркеров активации клетками ассоциированных с АС клонотипов демонстрирует активное участие таких клонов Т-клеток в воспалительной реакции. Дальнейшие исследования, направленные на изучение клонального состава функционально различных субпопуляций Т-клеток и определение антигенной специфичности выявленных клонотипов, позволят глубже понять механизмы возникновения и развития АС и разработать способы специфической терапии данного заболевания.

Литература

1. Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis — insights into pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Feb; 12 (2): 81–91. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.133.
2. Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*. 1990 Apr; 11 (4): 137–42.
3. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T-Cell Receptor Beta Motifs Specific to HLA-B27(+) Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
4. Komech EA, Pogorelyy MV, Egorov ES, Britanova OV, Rebrikov DV, Bochkova AG et al. CD8+ T cells with characteristic TCR beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. *Rheumatology (Oxford)*. Forthcoming 2018.
5. Duchmann R, May E, Ackermann B, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self-antigens are dominated by closely related TCRBV gene segments. A study in patients with reactive arthritis. *Scand J Immunol*. 1996 Jan; 43 (1): 101–8.
6. Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–9.
7. May E, Dulphy N, Frauendorf E, Duchmann R, Bowness P, Lopez de Castro JA et al. Conserved TCR beta chain usage in reactive arthritis: evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens*. 2002 Oct; 60 (4): 299–308.
8. Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2011 Nov 20; 9 (1): 72–4. DOI: 10.1038/nmeth.1778.
9. Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Putintseva EV et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol*. 2013; 4: 456. Published online 2013 Dec 23. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00456.
10. Zvyagin IV, Mamedov IZ, Tatarinova OV, Komech EA, Kurnikova EE, Boyakova EV et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia*. 2017; (31): 1145–53. DOI: 10.1038/leu.2016.321.
11. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods*. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960. Epub 2014 May 4.
12. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods*. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
13. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. DOI: 10.4049/jimmunol.1302064.
14. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2014. Available from: <http://www.r-project.org/>.
15. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*. 2004 Mar; 72 (3): 203–12. DOI: 10.1046/j.0902-4441.2003.00199.x.
16. Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative Profiling of Immune Repertoires for Minor Lymphocyte Counts Using Unique Molecular Identifiers. *J Immunol*. 2015 Jun 15; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.1049/jimmunol.1500215.
17. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9; 111 (36): 13139–44. DOI: 10.1073/pnas.1409155111.
18. Koning D, Costa AI, Hoof I, Miles JJ, Nanlohy NM, Ladell K et al. CD8+ TCR repertoire formation is guided primarily by the peptide component of the antigenic complex. *J Immunol*. 2013 Feb 1; 190 (3): 931–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1202466.
19. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J et al. Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell*. 2014 May 22; 157 (5): 1073–87. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.047.
20. Zvyagin IV, Pogorelyy MV, Ivanova ME, Komech EA, Shugay M, Bolotin DA et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 22; 111 (16): 5980–5. DOI: 10.1073/pnas.1319389111.
21. Elhanati Y, Murugan A, Callan CG, Mora T, Walczak AM. Quantifying selection in immune receptor repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 8; 111 (27): 9875–80. DOI: 10.1073/pnas.1409572111.
22. Pogorelyy MV, Minervina AA, Chudakov DM, Mamedov IZ, Lebedev YB, Mora T et al. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. *BioRxiv* 195057. DOI: 10.1101/195057.
23. Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–39.
24. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol*. 2009 Dec 15; 183 (12): 7919–30. DOI: 10.4049/jimmunol.08039003.
25. Meditz AL, Haas MK, Folkvord JM, Melander K, Young R, McCarter M et al. HLA-DR+ CD38+ CD4+ T Lymphocytes Have Elevated CCR5 Expression and Produce the Majority of R5-Tropic HIV-1 RNA In Vivo. *J Virol*. 2011 Oct; 85 (19): 10189–200. DOI: 10.1128/JVI.02529-10. Epub 2011 Aug 3.
26. Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M et al. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. *J Immunol*. 2013 Mar 1; 190 (5): 2150–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1202234.
27. Blom K, Braun M, Pakalniene J, Dailidyte L, Béziat V, Lampen MH et al. Specificity and dynamics of effector and memory CD8 T cell responses in human tick-borne encephalitis virus infection. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 22; 11 (1): e1004622. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004622.
28. Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, Ignatz-Hoover J et al. Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology*. 2013 Sep; 140 (1): 87–97. DOI: 10.1111/imm.12114.
29. Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L et al. The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *Pathobiology*. 2017 Dec 6. DOI: 10.1159/000484250. [Epub ahead of print.]
30. Shugay M, Bagaev DV, Zvyagin IV, Vroomans RM, Crawford JC, Dolton G et al. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4; 46 (D1): D419–D427. DOI: 10.1093/nar/gkx760.

References

1. Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis — insights into pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Feb; 12 (2): 81–91. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.133.
2. Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*. 1990 Apr; 11 (4): 137–42.
3. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinder M, Pepin F et al. Discovery of T-Cell Receptor Beta Motifs Specific to HLA-B27(+) Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
4. Komech EA, Pogorelyy MV, Egorov ES, Britanova OV, Rebrikov DV, Bochkova AG et al. CD8+ T cells with characteristic TCR beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. *Rheumatology (Oxford)*. Forthcoming 2018.
5. Duchmann R, May E, Ackermann B, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self-antigens are dominated by closely related TCRBV gene segments. A study in patients with reactive arthritis. *Scand J Immunol*. 1996 Jan; 43 (1): 101–8.
6. Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–9.
7. May E, Dulphy N, Frauendorf E, Duchmann R, Bowness P, Lopez de Castro JA et al. Conserved TCR beta chain usage in reactive arthritis: evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens*. 2002 Oct; 60 (4): 299–308.
8. Kivioja T, Vähäurautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2011 Nov 20; 9 (1): 72–4. DOI: 10.1038/nmeth.1778.
9. Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Putintseva EV et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol*. 2013; 4: 456. Published online 2013 Dec 23. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00456.
10. Zvyagin IV, Mamedov IZ, Tatarinova OV, Komech EA, Kurnikova EE, Boyakova EV et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia*. 2017; (31): 1145–53. DOI: 10.1038/leu.2016.321.
11. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods*. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960. Epub 2014 May 4.
12. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods*. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
13. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. DOI: 10.4049/jimmunol.1302064.
14. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2014. Available from: <http://www.r-project.org/>.
15. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*. 2004 Mar; 72 (3): 203–12. DOI: 10.1046/j.0902-4441.2003.00199.x.
16. Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative Profiling of Immune Repertoires for Minor Lymphocyte Counts Using Unique Molecular Identifiers. *J Immunol*. 2015 Jun 15; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.1049/jimmunol.1500215.
17. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9; 111 (36): 13139–44. DOI: 10.1073/pnas.1409155111.
18. Koning D, Costa AI, Hoof I, Miles JJ, Nanlohy NM, Ladell K et al. CD8+ TCR repertoire formation is guided primarily by the peptide component of the antigenic complex. *J Immunol*. 2013 Feb 1; 190 (3): 931–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1202466.
19. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J et al. Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell*. 2014 May 22; 157 (5): 1073–87. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.047.
20. Zvyagin IV, Pogorelyy MV, Ivanova ME, Komech EA, Shugay M, Bolotin DA et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 22; 111 (16): 5980–5. DOI: 10.1073/pnas.1319389111.
21. Elhanati Y, Murugan A, Callan CG, Mora T, Walczak AM. Quantifying selection in immune receptor repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 8; 111 (27): 9875–80. DOI: 10.1073/pnas.1409572111.
22. Pogorelyy MV, Minervina AA, Chudakov DM, Mamedov IZ, Lebedev YB, Mora T et al. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. *BioRxiv* 195057. DOI: 10.1101/195057.
23. Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–9.
24. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol*. 2009 Dec 15; 183 (12): 7919–30. DOI: 10.4049/jimmunol.08039003.
25. Meditz AL, Haas MK, Folkvord JM, Melander K, Young R, McCarter M et al. HLA-DR+ CD38+ CD4+ T Lymphocytes Have Elevated CCR5 Expression and Produce the Majority of R5-Tropic HIV-1 RNA In Vivo. *J Virol*. 2011 Oct; 85 (19): 10189–200. DOI: 10.1128/JVI.02529-10. Epub 2011 Aug 3.
26. Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M et al. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. *J Immunol*. 2013 Mar 1; 190 (5): 2150–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1202234.
27. Blom K, Braun M, Pakalniene J, Dailidyte L, Béziat V, Lampen MH et al. Specificity and dynamics of effector and memory CD8 T cell responses in human tick-borne encephalitis virus infection. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 22; 11 (1): e1004622. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004622.
28. Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, Ignatz-Hoover J et al. Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology*. 2013 Sep; 140 (1): 87–97. DOI: 10.1111/imm.12114.
29. Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L et al. The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *Pathobiology*. 2017 Dec 6. DOI: 10.1159/000484250. [Epub ahead of print.]
30. Shugay M, Bagaev DV, Zvyagin IV, Vroomans RM, Crawford JC, Dolton G et al. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4; 46 (D1): D419–D427. DOI: 10.1093/nar/gkx760.

РЕГИСТРАЦИЯ ДИНАМИКИ СООТНОШЕНИЯ НАД⁺/НАДН В ТКАНЯХ ЭМБРИОНОВ РЫБ *DANIO RERIO* С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО БИОСЕНСОРА

Д. С. Билан^{1,2}, А. Г. Шохина¹, А. С. Панова^{1,3}, В. В. Белоусов^{1,2} ✉

¹ Лаборатория молекулярных технологий, Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

² Отдел нейро-компьютерных интерфейсов, НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³ Кафедра биохимии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Рыба *Danio rerio* является популярным модельным объектом во многих медико-биологических исследованиях, в том числе для моделирования человеческих заболеваний и скрининга лекарственных препаратов. Генетически кодируемые биосенсоры на базе флуоресцентных белков широко используются во всем мире для исследований сложных биологических процессов в живых системах любого уровня сложности *in vivo*. Главное преимущество таких молекулярных инструментов в том, что генетически кодируемые индикаторы позволяют исследователям наблюдать за биологическими процессами в интактных системах в режиме реального времени. В данной работе мы впервые протестировали биосенсор SoNar для регистрации такого важного внутриклеточного параметра, как соотношение НАД⁺/НАДН, в тканях эмбрионов рыбы *D. rerio*. Мы исследовали, как изменяется динамика соотношения НАД⁺/НАДН в желточном мешке и тканях тела малька рыбы при инъекции продуктов гликолиза лактата и пирувата.

Ключевые слова: генетически кодируемые биосенсоры, *Danio rerio*, пируват, лактат

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований мол_а_дк № 16-34-60175 и гранта Президента РФ № МК-6339.2016.4, а также с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

✉ **Для корреспонденции:** Белоусов Всеволод Вадимович
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; belousov@ibch.ru

Статья получена: 05.12.2017 **Статья принята к печати:** 25.12.2017

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.005

OBSERVING THE DYNAMICS OF THE NAD⁺ TO NADH RATIO IN *DANIO RERIO* EMBRYO TISSUES USING A GENETICALLY ENCODED BIOSENSOR

Bilan DS^{1,2}, Shokhina AG¹, Panova AS^{1,3}, Belousov VV^{1,2} ✉

¹ Laboratory of Molecular Technologies, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

² Department of Brain-Machine Interfaces, Research Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The zebrafish *Danio rerio* is a popular model species for biomedical research focusing on modeling human diseases and screening of therapeutic drugs. Genetically encoded biosensors based on fluorescent proteins are widely used in many laboratories worldwide to study the biology of living systems of various complexity *in vivo*. The main advantage of these molecular tools is that they allow observing biological processes in intact systems in real time. In the present work we study the dynamics of the intracellular ratio of NAD⁺ to NADH in the yolk sac and tissues of *D. rerio* larvae using the SoNar biosensor following the injection of glycolysis end products, lactate and pyruvate.

Keywords: genetically encoded biosensors, *Danio rerio*, pyruvate, lactate

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant 16-34-60175) and the Russian Federation Presidential Grant MK-6339.2016.4. Experiments were partially carried out using the equipment provided by the IBCH core facility (CKP IBCH, supported by Russian Ministry of Education and Science, grant RFMEFI62117X0018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vsevolod Belousov
ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; belousov@ibch.ru

Received: 05.12.2017 **Accepted:** 25.12.2017

DOI: 10.24075/brsmu.2018.005

Рыба *Danio rerio* используется в качестве модельного объекта во многих современных медико-биологических исследованиях *in vivo*. По сравнению с другими лабораторными животными *D. rerio* имеет ряд преимуществ: рыб легко содержать в лабораторных условиях, при этом они дают большое количество потомства, которое быстро развивается. Из-за прозрачности тканей на ранних стадиях раз-

вития данный объект хорошо подходит для микроскопии. Кроме того, геном этого организма хорошо изучен, что позволяет легко осуществлять различные генные модификации. Благодаря этим достоинствам *D. rerio* часто используют для изучения функций генов, а также в исследованиях в области биологии развития позвоночных. Поскольку биохимические процессы и функциональная активность

белков в клетках рыбы имеют много общего с процессами и активностью белков в клетках млекопитающих, *D. rerio* успешно применяют для моделирования человеческих заболеваний, а также скрининга лекарственных препаратов и тестирования токсичности соединений на стадии доклинических испытаний.

За последние годы на основе рыбы *D. rerio* было смоделировано много заболеваний. В качестве примеров можно привести острый лимфобластный лейкоз [1–3], меланому [4, 5], мышечную дистрофию [6], сахарный диабет [7], заболевания различных органов, включая сердце [8–10], почки [11, 12], заболевания центральной нервной системы [13, 14], в том числе ишемию головного мозга [15, 16]. Используя такие модели, можно исследовать, как влияют разные химические соединения на изучаемый физиологический или патологический процессы. В самом простом варианте тестируемое соединение может быть добавлено непосредственно в воду, поскольку вещество попадет в кровь животного через жабры. Однако большинство исследований проводят на мальках *D. rerio*, поэтому эффективную доставку вещества в организм можно осуществить напрямую с помощью его инъекции в желточный мешок эмбриона. Например, в ряде работ таким образом исследовали кардиотоксичный эффект некоторых препаратов (аспирин, кломипрамин, нимодипин, верапамил и др.) [17, 18]. Кроме этого, в мальков можно инъектировать метаболиты, которые в норме участвуют в различных биохимических процессах, как, например, глюкоза, которую вводили в эмбрион в многократном избытке для изучения профиля экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм углеводов [19]. Кроме молекул различных веществ в мальков *D. rerio* инъектировали клетки других организмов: бактериальные клетки для наблюдения за развитием инфекции [20–22] и даже клетки млекопитающих для исследования роста опухолей определенного вида [23, 24].

Исследования физиологических и патологических процессов *in vivo* вышли на новый уровень с появлением генетически кодируемых биосенсоров на основе флуоресцентных белков. Каждый такой биосенсор представляет собой химерную белковую молекулу, которая, как правило, состоит из сенсорной и флуоресцентной частей. Сенсорный домен чувствителен к изменению определенного биологического параметра, например внутриклеточной концентрации интересующего соединения. При этом флуоресцентная часть биосенсора позволяет визуализировать взаимодействие сенсорного домена и соединения и интерпретировать полученный сигнал. Такие биосенсоры кодируются геном, который можно внести в любой живой организм. Главное преимущество этого подхода заключается в том, что регистрацию интересующего параметра можно осуществлять в живом объекте в режиме реального времени [25]. Во многих случаях генетически кодируемые биосенсоры являются безальтернативным методом исследования сложных биологических процессов. Флуоресцентные биосенсоры неоднократно применяли в модельном объекте *D. rerio*, в том числе для изучения процессов эмбриогенеза [26], воспаления [27], регенерации органов [28].

В настоящей работе мы впервые протестировали генетически кодируемый биосенсор SoNar [29] для регистрации цитоплазматического окислительно-восстановительного статуса никотинамидадениндинуклеотида (НАД(Н)) в тканях *D. rerio*. Соотношение окисленной формы (НАД⁺) и восстановленной (НАДН) имеет важнейшее значение не только для энергетического метаболизма клетки, но и

регуляции многих сигнальных каскадов [30–32]. Мы также установили, как соотношение НАД⁺/НАДН изменяется в желточном мешке и теле эмбриона *D. rerio* при инъекции таких важных метаболитов, как лактат и пируват.

Биосенсор SoNar [29] был создан на основе бактериального белка T-Rex из *Thermus aquaticus*, который является важным регулятором транскрипции некоторых ферментов в ответ на изменение внутриклеточного соотношения НАД⁺/НАДН. В подвижную область этого белка был интегрирован флуоресцентный белок сrYFP. Конформационные изменения, которые происходят при связывании белком T-Rex НАД⁺ или НАДН, передаются на флуоресцентный белок, изменяя его спектральные свойства (рис. 1). Для спектра возбуждения флуоресценции SoNar характерно наличие двух пиков в области 420 и 490 нм, при этом для сенсора характерен один пик эмиссии с максимумом 518 нм. Сигнал биосенсора рассчитывается как соотношение значений интенсивности флуоресценции, независимо возбуждаемой при 420 и 490 нм (F_{420}/F_{490}) [29]. Таким образом, сигнал имеет ратиометрический характер, что особенно важно при работе *in vivo*, поскольку позволяет избежать артефактов, связанных с разным уровнем экспрессии сенсора в разных клетках, подвижностью объекта и изменением его формы, толщиной тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рыбы *Danio rerio* линии AB/TL содержались в специально оборудованном помещении при 26,5 °C с заданным режимом день–ночь 12 : 12. Все эксперименты над животными осуществляли в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Для получения потомства родительских особей *D. rerio* за 4 ч до завершения светового дня попарно отсаживали в отдельные контейнеры, содержавшие по 500 мл среды E3. С наступлением светового дня собирали икру животных.

Для получения мальков *D. rerio*, экспрессирующих в тканях нужные генетически кодируемые биосенсоры (в работе использовали биосенсоры SoNar [29] и SypHer-2 [33]), мы нарабатывали *in vitro* их мРНК, используя коммерческий набор mMessage mMachine SP6 Transcription kit

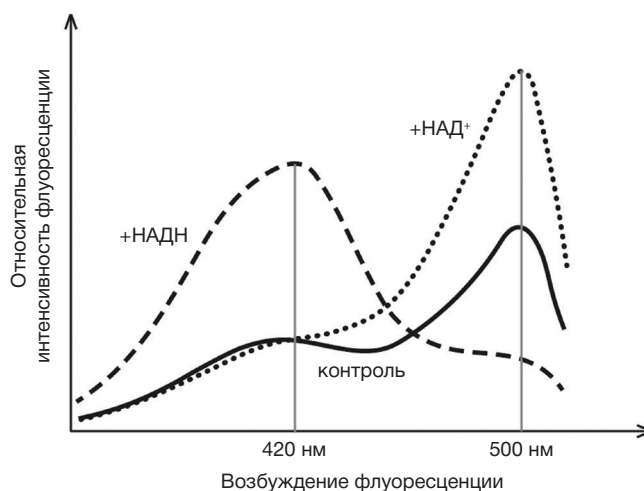


Рис. 1. Спектр возбуждения флуоресценции белкового препарата биосенсора SoNar. Для спектра возбуждения флуоресценции характерно наличие двух пиков с максимумами 420 и 490 нм. При добавлении к белку НАДН в его спектре происходит увеличение интенсивности в области 420 нм и, наоборот, уменьшение в области 490 нм. В присутствии НАД⁺ возрастает интенсивность в области 490 нм. Для биосенсора SoNar характерно наличие одного пика эмиссии флуоресценции с максимумом в области 518 нм

(Ambion, США). Далее 1 нл мРНК интересующего биосенсора с концентрацией 0,1 мкг/мкл инъецировали в желточные мешки эмбрионов рыб на стадии одной клетки с помощью микроинъектора Eppendorf Microinjector 5242. Инъецированные эмбрионы далее содержали в чашках Петри при 26,5 °C в комнате с заданным режимом день-ночь 12 : 12. Через 24 ч после микроинъекции эмбрионы скринировали под флуоресцентным микроскопом и отбирали флуоресцирующих. Перед микроскопией отобранные эмбрионы вручную извлекали из хорионов, обездвигивали в 0,02 % растворе трикаина и заключали в капле 1,5 % легкоплавкой агарозы. Растворы метаболитов (лактата натрия и пирувата натрия) инъецировали в желточные мешки обездвигивенных мальков в объеме 1 нл раствора концентрацией 200 мМ. Предварительно в экспериментах регистрировали исходные значения сигналов биосенсоров в выбранных областях каждой особи.

Микроскопию рыб проводили с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа Leica DM6000 (Leica, Германия), оснащенного объективом HC PL FLUOTAR 10.0*0.30 DRY. Для возбуждения флуоресценции исполь-

зовали фильтры CFP BP436/20 и GFP BP470/40 (Leica). Режим съемки составлял 1 кадр в минуту.

Обработку изображений данных, полученных с помощью микроскопа, выполняли с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH). Построение графиков динамики изменения сигнала сенсоров и статистическую обработку данных в каждой временной точке проводили с помощью программы OriginPro 8.6 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы протестировали работу генетически кодируемого биосенсора SoNar [29] для регистрации соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в тканях рыбы *D. rerio*. Для этого мы наработали мРНК биосенсора и инъецировали ее в желточные мешки эмбрионов рыб на стадии одной клетки. Через сутки с помощью флуоресцентного микроскопа мы отобрали флуоресцирующих особей для дальнейшей микроскопии. Регистрацию флуоресценции SoNar проводили в двух независимых каналах микроскопа, возбуждение флуоресценции в каждом из которых соответствует двум пикам

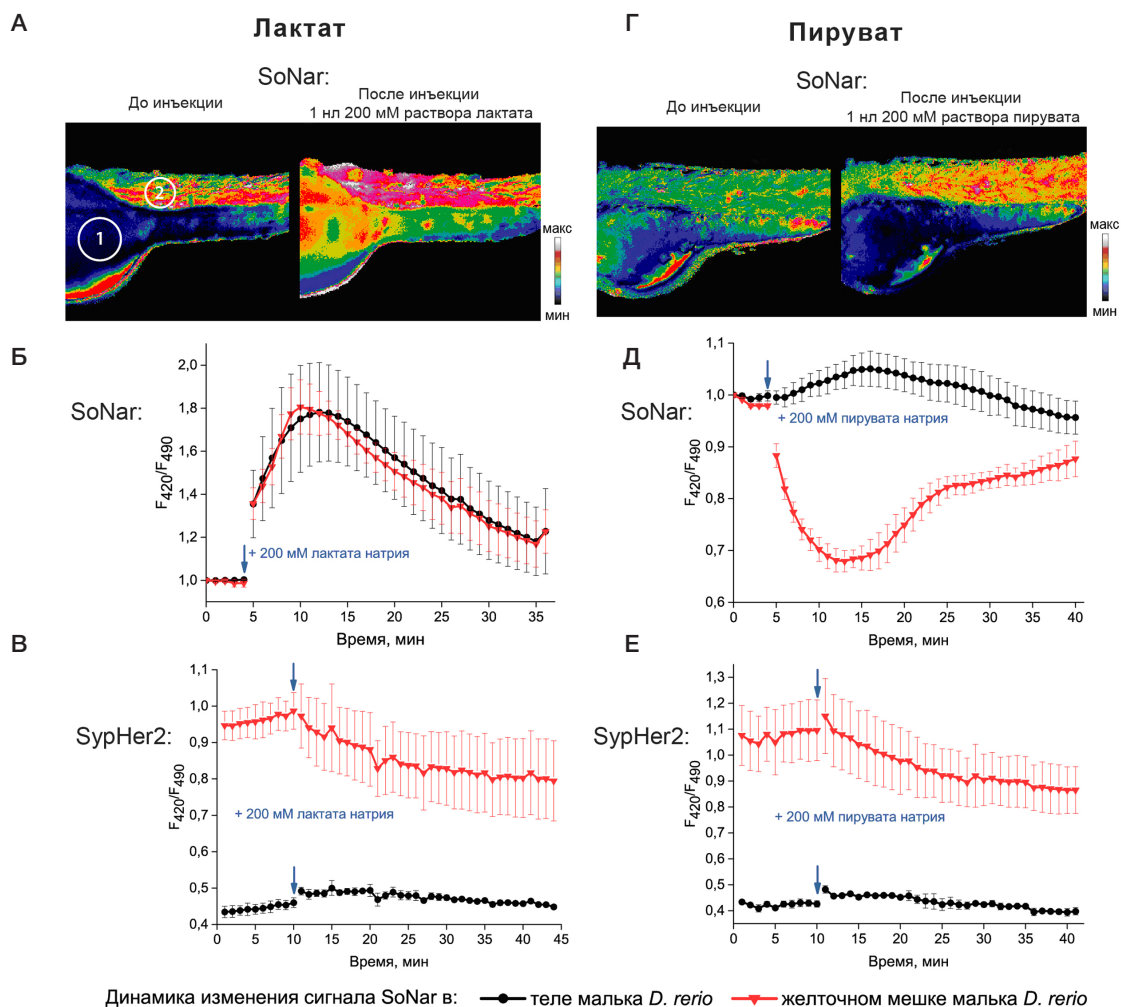


Рис. 2. Динамика изменения соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ и pH в тканях однодневных эмбрионов *D. rerio* до и после инъекции в желточный мешок растворов пирувата и лактата. (А и Г) Фотографии фрагментов тела малька *D. rerio* до и после инъекции 1 нл 200 мМ раствора лактата (А) и пирувата (Г). Фотографии раскрыты в псевдоцвета, которые соответствуют значению сигнала биосенсора SoNar (F_{420}/F_{490}). Области 1 и 2, отмеченные белым кругом на первой фотографии, обозначают участки на теле малька, в пределах которых регистрировалось изменение F_{420}/F_{490} . На других рыбах выбирали аналогичные области. (Б и Д) Динамика изменения соотношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$, регистрируемая с помощью биосенсора SoNar, в желточном мешке (красная линия) и теле (черная линия) малька *D. rerio* до и после инъекции растворов лактата (Б) и пирувата (Д). (В и Е) Динамика изменения pH, регистрируемая с помощью биосенсора SyHer2, в желточном мешке (красная линия) и теле (черная линия) малька *D. rerio* до и после инъекции растворов лактата (В) и пирувата (Е). На всех графиках (Б, В, Д, Е) планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению среднего значения. График (Б) построен по результатам, полученным на 10 животных; график (Д) построен по результатам, полученным на 11 животных; графики (В) и (Е) построены по результатам, полученным на 6 животных для каждого

биосенсора в его спектре возбуждения флуоресценции (рис. 1). Для этого мы получали изображение рыбы с возбуждением флуоресценции при 420 нм (F_{420}) и отдельно — изображение этой же рыбы при возбуждении флуоресценции в области 490 нм (F_{490}). Далее с помощью программного обеспечения ImageJ мы делили изображения двух каналов друг на друга и в результате получали изображение рыбы, которое раскрашивали в псевдоцвета, соответствующие значениям соотношения F_{420}/F_{490} (рис. 2, А, Г). Далее с помощью программы ImageJ на теле малька выбирали области, для которых производили расчеты. Графики, которые отображают в отмеченных областях динамику изменения соотношения F_{420}/F_{490} , строили с помощью программы OriginPro 8.6.

Для регистрации динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН с помощью биосенсора SoNar в тканях малька *D. rerio* мы использовали пируват и лактат. Известно, что метаболическая пара лактат/пируват находится в равновесии со свободными формами НАД⁺/НАДН в цитоплазме клеток благодаря реакции, катализируемой ферментом лактатдегидрогеназой [34, 35]. Поэтому в желточные мешки 10 эмбрионов *D. rerio* мы инъецировали по 1 нл 200 мМ раствора лактата натрия и других 11 мальков — также по 1 нл 200 мМ раствора пирувата натрия. Во всех случаях мы предварительно регистрировали в динамике сигнал биосенсора в тканях до инъекции. Стартовое значение сигнала биосенсора мы приравнивали к 1. После инъекции мальков как можно быстрее вновь помещали под флуоресцентный микроскоп и возобновляли съемку при тех же настройках. В случае с инъекцией лактата в желточный мешок и теле эмбриона наблюдалось значительное увеличение сигнала F_{420}/F_{490} , что свидетельствовало о восстановлении пула НАД(Н) (рис. 2, Б). Одинаковую динамику изменения сигнала биосенсора в различных областях тела животного можно объяснить быстрой доставкой веществ из желточного мешка в другие органы. Сигнал достигал своего максимального значения уже через 5 мин с момента инъекции, после чего снижался примерно до своего первоначального значения в течение 30 мин, поскольку лактат метаболизируется клеточными системами. При инъекции в желточные мешки эмбрионов рыб раствора пирувата мы ожидали увидеть обратный эффект. Однако сигнал биосенсора SoNar (F_{420}/F_{490}) уменьшился лишь в желточном мешке мальков, в то время как в теле животных он даже незначительно возрастал (рис. 2, Д). Это означает, что при инъекции пирувата в разных органах малька рыбы происходят противоположно направленные окислительно-восстановительные события с внутриклеточным пулом НАД(Н): окисление в желточном мешке и незначительное восстановление в теле эмбриона.

Транспорт лактата и пирувата в клетки может сопровождаться изменением значения pH, поскольку осуществляется в симпорте с H⁺ [36, 37]. Из-за структурных особенностей хромосом флуоресцентные белки чувствительны к изменениям pH окружения [38]. Чтобы оценить возможное влияние pH на динамику изменения сигнала SoNar в нашем эксперименте, в качестве контроля мы использовали биосенсор SypHer2, ранее разработанный в нашей лаборатории для регистрации pH [33]. Мы получили мРНК биосенсора SypHer2 и провели аналогичную серию экспериментов. Инъекции растворов лактата и пирувата не вызывали изменений pH в теле мальков. В желточном мешке оба метаболита вызывали лишь незначительное повышение pH, процесс развивался медленно в течение примерно 20 мин с момента инъекции (рис. 2, В, Е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволяют заключить, что генетически кодируемый биосенсор SoNar для регистрации динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН успешно может быть использован в исследованиях на моделях рыбы *D. rerio*. Этот важнейший биологический параметр может сильно изменяться при разнообразных патологических состояниях клеток. Используя модель определенного заболевания на рыбе *D. rerio*, конкретные ткани или клетки которой экспрессируют биосенсор SoNar, можно эффективно оценивать влияние различных веществ на соотношение НАД⁺/НАДН и, следовательно, на изучаемый патологический процесс.

Мы наблюдали, что инъекция лактата в желточный мешок эмбриона *D. rerio* приводит к значительному и одновременному восстановлению пула НАД(Н) во всех тканях организма рыбы. Однако инъекция пирувата вызвала окисление пула НАД(Н) лишь в желточном мешке, в то время как в теле эмбриона наблюдалось даже незначительное восстановление. В одной из недавних работ на модели *D. rerio* исследовали роль окислительно-восстановительных процессов при эмбриогенезе. Было показано, что мощное окисление происходит с момента начала стадии гаструлы, которое уменьшается лишь к достижению мальком возраста 3 дней. В этой работе было показано, что окислительный стресс играет ключевую роль в развитии некоторых органов в ходе эмбриогенеза [26]. Можно предположить, что мы не увидели значительного окисления в тканях тела эмбриона рыбы после инъекции пирувата, поскольку на этой стадии развития в тканях эмбриона многие окислительно-восстановительные процессы уже смещены в сторону окисления. Примечательно, что в приведенной нами статье, в которой исследовали окислительно-восстановительные процессы при эмбриогенезе, наименьший уровень активных форм кислорода, в частности пероксида водорода, наблюдался в желточном мешке, в котором мы как раз наблюдали динамику окисления НАД(Н) после инъекции пирувата. Незначительное восстановление пула НАД(Н) в теле малька при этом можно объяснить влиянием компенсаторных биохимических процессов.

Альтернативное объяснение состоит в том, что в желточном мешке пируват восстанавливается до лактата, что подтверждается падением концентрации НАДН, но в теле малька предпочтительнее транспортируется именно лактат, благодаря чему мы регистрировали изменение сигнала биосенсора в сторону незначительного роста концентрации НАДН. Однако подтверждение этих гипотез требует проведения отдельного исследования.

ВЫВОДЫ

В нашей работе мы впервые показали, что генетически кодируемый биосенсор SoNar для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН может быть использован в тканях *D. rerio*. Инъекция лактата в желточный мешок однодневных эмбрионов рыб приводит к быстрому восстановлению пула НАД(Н) во всех тканях животного, таким образом, пул веществ в желточном мешке хорошо сообщается с другими тканями. Инъекция пирувата вызвала окисление лишь в желточном мешке, в то время как в теле малька наблюдалось незначительное восстановление. Используя биосенсор SypHer2, мы установили, что при инъекции пирувата и лактата незначительные изменения pH происходят только в желточном мешке.

Литература

- Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*. 2003 Feb 7; 299 (5608): 887–90. DOI: 10.1126/science.1080280.
- Chen J, Jette C, Kanki JP, Aster JC, Look AT, Griffin JD. NOTCH1-induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. *Leukemia*. 2007 Mar; 21 (3): 462–71. DOI: 10.1038/sj.leu.2404546.
- Feng H, Stachura DL, White RM, Gutierrez A, Zhang L, Sanda T et al. T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer Cell*. 2010 Oct 19; 18 (4): 353–66. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.009.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol*. 2005 Feb 8; 15 (3): 249–54. DOI: 10.1016/j.cub.2005.01.031.
- Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, Distel M, Kelly A, Koster RW et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PLoS One*. 2010 Dec 10; 5 (12): e15170. DOI: 10.1371/journal.pone.0015170.
- Bassett DL, Currie PD. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet*. 2003 Oct 15; 12 Spec No 2: R265–70. DOI: 10.1093/hmg/ddg279.
- Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep*. 2017 May 3; 7 (1): 1461. DOI: 10.1038/s41598-017-01432-w.
- Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE et al. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development*. 1996 Dec; 123: 285–92.
- Asnani A, Peterson RT. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Dis Models Mech*. 2014 Jul; 7 (7): 763–7. DOI: 10.1242/dmm.016170.
- Chablais F, Veit J, Rainer G, Jazwinska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol*. 2011 Apr 7; 11: 21. DOI: 10.1186/1471-213X-11-21.
- Morales EE, Wingert RA. Zebrafish as a model of kidney disease. *Results Probl Cell Differ*. 2017; 60: 55–75. DOI: 10.1007/978-3-319-51436-9_3.
- Swanhart LM, Cosentino CC, Diep CQ, Davidson AJ, de Caestecker M, Hukriede NA. Zebrafish kidney development: basic science to translational research. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011 Jun; 93 (2): 141–56. DOI: 10.1002/bdrc.20209.
- Martin-Jimenez R, Campanella M, Russell C. New zebrafish models of neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015 Jun; 15 (6): 33. DOI: 10.1007/s11910-015-0555-z.
- Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011 Jun; 11 (3): 274–82. DOI: 10.1007/s11910-011-0182-2.
- Yu X, Li YV. Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011; 3 (2): 88–96. Epub 2011 Apr 20.
- Yu X, Li YV. Zebrafish (*Danio rerio*) developed as an alternative animal model for focal ischemic stroke. *Acta Neurochir Suppl*. 2016; 121: 115–9. DOI: 10.1007/978-3-319-18497-5_20.
- Zhu JJ, Xu YQ, He JH, Yu HP, Huang CJ, Gao JM et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *J Appl Toxicol*. 2014; 34 (2): 139–48. DOI: 10.1002/jat.2843.
- Liang J, Jin W, Li H, Liu H, Huang Y, Shan X, et al. In vivo cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae. *Molecules*. 2016 Feb 23; 21 (3): 190. DOI: 10.3390/molecules21030190.
- Rocha F, Dias J, Engrola S, Gavaia P, Geurden I, Dinis MT et al. Glucose overload in yolk has little effect on the long-term modulation of carbohydrate metabolic genes in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol*. 2014 Apr 1; 217 (Pt 7): 1139–49. DOI: 10.1242/jeb.095463.
- Cronan MR, Tobin DM. Fit for consumption: zebrafish as a model for tuberculosis. *Dis Model Mech*. 2014 Jul; 7 (7): 777–84. DOI: 10.1242/dmm.016089.
- Mostowy S, Boucontet L, Mazon Moya MJ, Sirianni A, Boudinot P, Hollinshead M et al. The zebrafish as a new model for the in vivo study of *Shigella flexneri* interaction with phagocytes and bacterial autophagy. *PLoS Pathog*. 2013; 9 (9): e1003588. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003588.
- Veneman WJ, Stockhammer OW, de Boer L, Zaat SA, Meijer AH, Spaink HP. A zebrafish high throughput screening system used for *Staphylococcus epidermidis* infection marker discovery. *BMC Genomics*. 2013 Apr 15; 14: 255. DOI: 10.1186/1471-2164-14-255.
- Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Translating discovery in zebrafish pancreatic development to human pancreatic cancer: biomarkers, targets, pathogenesis, and therapeutics. *Zebrafish*. 2013 Jun; 10 (2): 132–46. DOI: 10.1089/zeb.2012.0817.
- Lee HJ, Yang YJ, Jeong S, Lee JD, Choi SY, Jung DW et al. Development of a vestibular schwannoma xenograft zebrafish model for in vivo antitumor drug screening. *Laryngoscope*. 2016 Dec; 126 (12): E409–E415. DOI: 10.1002/lary.26043.
- Bilan DS, Belousov VV. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. *Free Radic Biol Med*. 2017 Aug; 109: 167–88. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.004.
- Gauron C, Meda F, Dupont E, Albadri S, Quenech'Du N, Ipendey E et al. Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Dev Biol*. 2016 Jun 15; 414 (2): 133–41. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.05.004.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009 Jun 18; 459 (7249): 996–9. DOI: 10.1038/nature08119.
- Han P, Zhou XH, Chang N, Xiao CL, Yan S, Ren H et al. Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism. *Cell Res*. 2014 Sep; 24 (9): 1091–107. DOI: 10.1038/cr.2014.108.
- Zhao Y, Hu Q, Cheng F, Su N, Wang A, Zou Y et al. SoNar, a highly responsive NAD⁺/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents. *Cell metab*. 2015 May; 21 (5): 777–89. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.04.009.
- Ying W. NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci*. 2006 Sep 1; 11: 3129–48.
- Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb; 10 (2): 179–206. DOI: 10.1089/ars.2007.1672.
- Verdin E. NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*. 2015 Dec 4; 350 (6265): 1208–13. DOI: 10.1126/science.aac4854.
- Matlashov ME, Bogdanova YA, Ermakova GV, Mishina NM, Ermakova YG, Nikitin ES et al. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Nov; 1850 (11): 2318–28. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.08.002.
- Bucher T, Brauser B, Conze A, Klein F, Langguth O, Sies H. State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADH-system as disclosed by equilibration with extracellular lactate-pyruvate in hemoglobin-free perfused rat liver. *Eur J Biochem*. 1972 May 23; 27 (2): 301–17.
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J*. 1967 May; 103 (2): 514–27.
- Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol*. 1993 Apr; 264 (4 Pt 1): C761–82. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.264.4.C761.
- Zima AV, Kockskemper J, Mejia-Alvarez R, Blatter LA. Pyruvate modulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rats via mitochondria-dependent and -independent mechanisms. *J Physiol*. 2003; 550 (Pt 3): 765–83.
- Elsiger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K, Remington SJ. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry*. 1999 Apr 27; 38 (17): 5296–301. DOI: 10.1021/bi9902182.

References

- Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*. 2003 Feb 7; 299 (5608): 887–90. DOI: 10.1126/science.1080280.
- Chen J, Jette C, Kanki JP, Aster JC, Look AT, Griffin JD. NOTCH1-induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. *Leukemia*. 2007 Mar; 21 (3): 462–71. DOI: 10.1038/sj.leu.2404546.
- Feng H, Stachura DL, White RM, Gutierrez A, Zhang L, Sanda T et al. T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer Cell*. 2010 Oct 19; 18 (4): 353–66. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.009.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol*. 2005 Feb 8; 15 (3): 249–54. DOI: 10.1016/j.cub.2005.01.031.
- Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, Distel M, Kelly A, Koster RW et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PloS One*. 2010 Dec 10; 5 (12): e15170. DOI: 10.1371/journal.pone.0015170.
- Bassett DI, Currie PD. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet*. 2003 Oct 15; 12 Spec No 2: R265–70. DOI: 10.1093/hmg/ddg279.
- Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep*. 2017 May 3; 7 (1): 1461. DOI: 10.1038/s41598-017-01432-w.
- Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE et al. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development*. 1996 Dec; 123: 285–92.
- Asnani A, Peterson RT. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Dis Models Mech*. 2014 Jul; 7 (7): 763–7. DOI: 10.1242/dmm.016170.
- Chablais F, Veit J, Rainer G, Jazwinska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol*. 2011 Apr 7; 11: 21. DOI: 10.1186/1471-213X-11-21.
- Morales EE, Wingert RA. Zebrafish as a model of kidney disease. *Results Probl Cell Differ*. 2017; 60: 55–75. DOI: 10.1007/978-3-319-51436-9_3.
- Swanhart LM, Cosentino CC, Diep CQ, Davidson AJ, de Caestecker M, Hukriede NA. Zebrafish kidney development: basic science to translational research. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011 Jun; 93 (2): 141–56. DOI: 10.1002/bdrc.20209.
- Martin-Jimenez R, Campanella M, Russell C. New zebrafish models of neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015 Jun; 15 (6): 33. DOI: 10.1007/s11910-015-0555-z.
- Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011 Jun; 11 (3): 274–82. DOI: 10.1007/s11910-011-0182-2.
- Yu X, Li YV. Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011; 3 (2): 88–96. Epub 2011 Apr 20.
- Yu X, Li YV. Zebrafish (*Danio rerio*) developed as an alternative animal model for focal ischemic stroke. *Acta Neurochir Suppl*. 2016; 121: 115–9. DOI: 10.1007/978-3-319-18497-5_20.
- Zhu JJ, Xu YQ, He JH, Yu HP, Huang CJ, Gao JM et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *J Appl Toxicol*. 2014; 34 (2): 139–48. DOI: 10.1002/jat.2843.
- Liang J, Jin W, Li H, Liu H, Huang Y, Shan X, et al. In vivo cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae. *Molecules*. 2016 Feb 23; 21 (3): 190. DOI: 10.3390/molecules21030190.
- Rocha F, Dias J, Engrola S, Gavaia P, Geurden I, Dinis MT et al. Glucose overload in yolk has little effect on the long-term modulation of carbohydrate metabolic genes in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol*. 2014 Apr 1; 217 (Pt 7): 1139–49. DOI: 10.1242/jeb.095463.
- Cronan MR, Tobin DM. Fit for consumption: zebrafish as a model for tuberculosis. *Dis Model Mech*. 2014 Jul; 7 (7): 777–84. DOI: 10.1242/dmm.016089.
- Mostowy S, Boucontet L, Mazon Moya MJ, Sirianni A, Boudinot P, Hollinshead M et al. The zebrafish as a new model for the in vivo study of *Shigella flexneri* interaction with phagocytes and bacterial autophagy. *PLoS Pathog*. 2013; 9 (9): e1003588. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003588.
- Veneman WJ, Stockhammer OW, de Boer L, Zaat SA, Meijer AH, Spalink HP. A zebrafish high throughput screening system used for *Staphylococcus epidermidis* infection marker discovery. *BMC Genomics*. 2013 Apr 15; 14: 255. DOI: 10.1186/1471-2164-14-255.
- Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Translating discovery in zebrafish pancreatic development to human pancreatic cancer: biomarkers, targets, pathogenesis, and therapeutics. *Zebrafish*. 2013 Jun; 10 (2): 132–46. DOI: 10.1089/zeb.2012.0817.
- Lee HJ, Yang YJ, Jeong S, Lee JD, Choi SY, Jung DW et al. Development of a vestibular schwannoma xenograft zebrafish model for in vivo antitumor drug screening. *Laryngoscope*. 2016 Dec; 126 (12): E409–E415. DOI: 10.1002/lary.26043.
- Bilan DS, Belousov VV. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. *Free Radic Biol Med*. 2017 Aug; 109: 167–88. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.004.
- Gauron C, Meda F, Dupont E, Albadri S, Quenech'Du N, Ipendey E et al. Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Dev Biol*. 2016 Jun 15; 414 (2): 133–41. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.05.004.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009 Jun 18; 459 (7249): 996–9. DOI: 10.1038/nature08119.
- Han P, Zhou XH, Chang N, Xiao CL, Yan S, Ren H et al. Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism. *Cell Res*. 2014 Sep; 24 (9): 1091–107. DOI: 10.1038/cr.2014.108.
- Zhao Y, Hu Q, Cheng F, Su N, Wang A, Zou Y et al. SoNar, a highly responsive NAD⁺/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents. *Cell metab*. 2015 May; 21 (5): 777–89. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.04.009.
- Ying W. NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci*. 2006 Sep 1; 11: 3129–48.
- Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb; 10 (2): 179–206. DOI: 10.1089/ars.2007.1672.
- Verdin E. NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*. 2015 Dec 4; 350 (6265): 1208–13. DOI: 10.1126/science.aac4854.
- Matlashov ME, Bogdanova YA, Ermakova GV, Mishina NM, Ermakova YG, Nikitin ES et al. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Nov; 1850 (11): 2318–28. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.08.002.
- Bucher T, Brauser B, Conze A, Klein F, Langguth O, Sies H. State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADH-system as disclosed by equilibration with extracellular lactate-pyruvate in hemoglobin-free perfused rat liver. *Eur J Biochem*. 1972 May 23; 27 (2): 301–17.
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J*. 1967 May; 103 (2): 514–27.
- Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol*. 1993 Apr; 264 (4 Pt 1): C761–82. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.264.4.C761.
- Zima AV, Kockskamper J, Mejia-Alvarez R, Blatter LA. Pyruvate modulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rats via mitochondria-dependent and -independent mechanisms. *J Physiol*. 2003; 550 (Pt 3): 765–83.
- Elsiger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K, Remington SJ. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry*. 1999 Apr 27; 38 (17): 5296–301. DOI: 10.1021/bi9902182.

НОВАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ СИСТЕМА ГРИБОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

З. М. Осипова, А. С. Щеглов , И. В. Ямпольский

Отдел биомолекулярной химии,
Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Биолюминесценция — это химическое окисление небольшой молекулы люциферина кислородом воздуха под действием белка люциферазы, которое сопровождается эмиссией кванта света в видимой области спектра. На основе этой реакции были разработаны различные методы биолюминесцентного имиджинга — получения изображения в живом организме. Они активно используются в медицинских исследованиях. Однако недостатком существующих люминесцентных систем является необходимость добавления люциферина извне перед каждым экспериментом. В настоящей работе обсуждается возможность разработки автономной люминесцентной системы эукариот на основе биолюминесцентной системы высших грибов.

Ключевые слова: биолюминесценция, биоимиджинг, опухолевые модели *in vivo*, фотодинамическая терапия

Финансирование: работа поддержана Министерством образования и науки РФ, идентификатор проекта RFMEFI61317X0062.

 **Для корреспонденции:** Щеглов Александр Сергеевич
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; jukart@mail.ru

Статья получена: 15.12.2017 **Статья принята к печати:** 27.12.2017

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.004

A BIOLUMINESCENT SYSTEM OF FUNGI: PROSPECTS FOR APPLICATION IN MEDICAL RESEARCH

Osipova ZM, Shcheglov AS , Yampolsky IV

Department of Biomolecular Chemistry,
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Bioluminescence is chemical oxidation of a small luciferin molecule by air catalyzed by luciferase and accompanied by the emission of photons in the visible spectrum. This reaction is used in bioluminescent bioimaging, the method for the visualization of organism's interior. Bioimaging is a popular tool used in medical research. However, it has an unfortunate drawback: it requires introduction of external luciferin to the system before every experiment. In this work we discuss a possibility of developing an autonomous luminescent system in eukaryotes based on the bioluminescent system of higher fungi.

Keywords: bioluminescence, bioimaging, tumor models *in vivo*, photodynamic therapy

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Project ID RFMEFI61317X0062.

 **Correspondence should be addressed:** Alexander Shcheglov
ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; jukart@mail.ru

Received: 15.12.2017 **Accepted:** 27.12.2017

DOI: 10.24075/brsmu.2018.004

Среди живых существ встречаются тысячи видов, способных к излучению света. Такие виды называются биолюминесцентными. Большинство из них обитает на глубине морей и океанов, однако и на поверхности распространены светящиеся насекомые, черви, грибы. В процессе биолюминесценции происходит химическое окисление небольшой молекулы люциферина кислородом воздуха под действием белка люциферазы: квант света в видимой области спектра является одним из продуктов этой реакции. На ее основе были разработаны различные методы биолюминесцентного имиджинга (получения изображения в живом организме), нашедшие свое применение в области медицинских исследований, в особенности при изучении опухолевых заболеваний, и разработке лекарственных препаратов. В последние годы биоимиджинговые технологии становятся все более популярными ввиду беспрецедентной чувствительности при получении изображения в живом организме (вплоть до нескольких отдельных клеток).

Среди природного разнообразия уникальных пар «люциферин–люцифераза» (по разным оценкам, их около 40 [1]) реальное применение пока находят только хорошо изученные биолюминесцентные системы, а именно: система на основе D-люциферина светляка, бактериальная и целентеразиновая системы. При этом каждому люциферину соответствует набор «комплементарных» люцифераз из разных организмов. Например, для D люциферина известны около 30 природных люцифераз, для целентеразина — около 15 люцифераз и 8 фотопротеинов (стабильных субстрат-белковых комплексов) [2]. Как только становится известна аминокислотная последовательность природной люциферазы, появляется принципиальная возможность поместить кодирующий ее ген в другой организм и таким образом добиться экспрессии данного белка в изучаемых клетках. При добавлении люциферина извне нужные клетки будут люминесцировать, что и можно будет зафиксировать как аналитический сигнал. Помимо биоимиджинга

тканей и клеток возможен имиджинг отдельных органелл и даже межклеточных/межбелковых взаимодействий. А при условии одновременного использования разных люциферин, их функциональных аналогов и разных люцифераз (как природного типа, так и мутантных) возможности имиджинга возрастают многократно — становится реальным проведение мультицветовых исследований [3–6].

Биолюминесцентные методы в медицине

Самое широкое распространение в медицинских исследованиях получила биолюминесцентная реакция D люциферина светляка. Ее особенность в том, что она проходит только в присутствии кофактора аденозинтрифосфата (АТФ). Поэтому получение биолюминесцентного сигнала возможно только в условиях наличия АТФ, что позволяет однозначно определять концентрацию АТФ с помощью биолюминесценции. Поскольку в клетках АТФ работает как универсальный энергоноситель, то измерение его концентрации помогает оценить их метаболический потенциал, а также цитотоксичность различных препаратов или их влияние на пролиферацию клеток [7]. В то же время для работы бактериальной биолюминесцентной системы необходимо наличие таких кофакторов, как флавиномононуклеотид (ФМН) и никотинамидадениндинуклеотид (НАДН). Эта особенность используется для разработки аналитических методов биолюминесцентного определения НАД(Ф)Н, дегидрогеназ и, соответственно, различных метаболитов, окисление которых сопровождается восстановлением НАД⁺ до НАДН: малата, сорбита, этанола и т. д. Совместное применение светляковой и бактериальной люминесцентных систем позволяет создавать метаболические карты опухолевых тканей и находить возможные подходы к лечению опухолей [8–10].

Безусловно, наиболее полную картину развития ракового заболевания позволяют получить опухолевые модели *in vivo*. Следить за метастазированием клеток и ангиогенезом, а также ответом на лечение в глубоких тканях можно с использованием имиджинговых технологий, таких как МРТ, ПЭТ, радиография и др. По сравнению с традиционными методами биолюминесцентный имиджинг гораздо более предпочтителен ввиду высокой чувствительности. Возможно даже получение трехмерных изображений [11].

Для неинвазивного имиджинга опухолей используют, как правило, люциферазы *Photinus pyralis*, *Pyrophorus plagiophtalamus* (совместно с D-люциферин) и люци-

феразы *Renilla reniformis* и *Gaussia princeps* (совместно с целентеразином). В последнее время становится популярным применение небольшой люциферазы NanoLuc, которая работает с синтетическим люциферин фури-мазином [12]. Помимо люцифераз также часто используют конъюгаты люцифераз с флуоресцентными белками и квантовыми точками с целью смещения сигнала в более красную область спектра по BRET-механизму, что актуально для получения изображений в глубоких тканях [13, 14].

Еще одним направлением применения биолюминесценции в исследованиях рака является фотодинамическая терапия опухолей с помощью квантовых точек. Фотосенсибилизатор, обладающий значительным цитотоксическим эффектом на опухолевые клетки, находящиеся в глубоких тканях, может быть эффективно активирован светом от люциферазы по BRET-механизму [15, 16].

Люминесцентная система высших грибов — новая альтернатива

Существенным недостатком люминесцентных систем, применяемых для биоимиджинга в опухолевых исследованиях, является необходимость добавления люциферина извне перед каждым экспериментом. Единственная доступная на данный момент автономная люминесцентная система бактерий, состоящая из оперона *luxCDABE*, не может широко применяться из-за высокой токсичности. Изначально достаточно долго не удавалось провести экспрессию бактериальной системы в клетках эукариот, однако после полномасштабной перестройки бактериального оперона биолюминесценция в клетках дрожжей и человека стала возможной, но только при условии добавления люциферина извне [17]. И лишь в 2010 г. после дополнительной реорганизации генов в опероне впервые были получены автономно люминесцентные клетки человека [18].

На данный момент бактериальная люминесцентная система все еще непопулярна для применения в эукариотических клетках. Тем более, что, скорее всего, для ее переноса в другой организм потребуются такие же обширные манипуляции с опероном, которые были проделаны в случае первичной оптимизации *luxCDABE*, а именно: изменение регуляторных последовательностей, последовательности генов в опероне и создание дополнительных линкерных участков. Поэтому задача по разработке автономно люминесцентной системы по-прежнему актуальна.

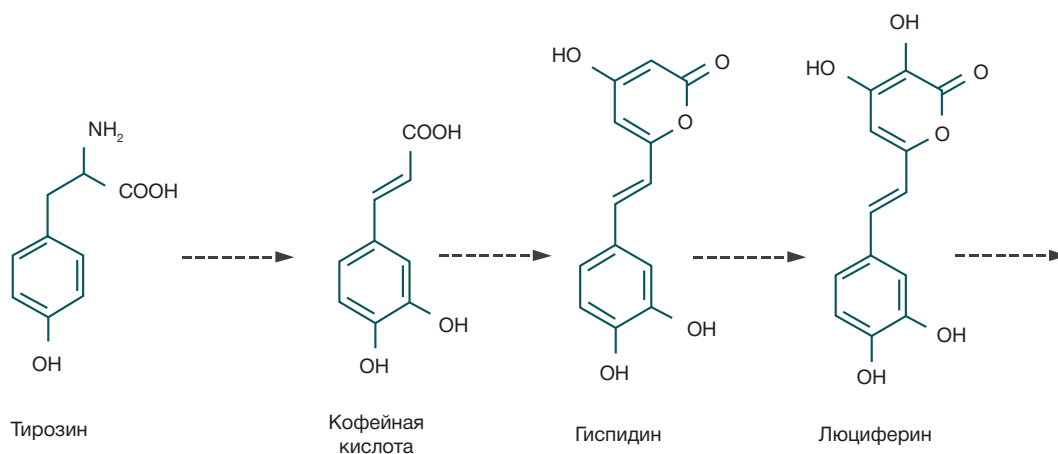


Схема биосинтеза люциферина светящихся высших грибов



Для применяемых на данный момент люциферин (D-люциферин, целентеразин) задача пока выглядит нерешаемой, поскольку нет четкого представления о путях биосинтеза этих молекул в живом организме. В то же время относительно недавно стала известна структура люциферина высших грибов — 3-гидроксигиспидина [19], и был подробно изучен механизм его билюминесценции [20]. Биосинтетическим прекурсором люциферина в грибах является кофейная кислота. Из нее люциферин получается в две стадии: сначала из производных кофейной кислоты каффеоила-CoA и малонила-CoA под действием поликетидсинтазы образуется гиспидин [21], который затем в светящихся грибах под действием гидроксилазы превращается в люциферин (рисунок).

Кофейная кислота — это широко распространенный вторичный метаболит растений. Перенос генов белков, ответственных за синтез и свечение люциферина, из грибов в другой эукариотический организм (в частности, в клетки растений) представляется гораздо более реалистичной задачей, чем работа с прокариотическими генами бактерий. Однако, на наш взгляд, существует также и принципиальная возможность получения на основе генов из люминесцентной системы грибов автономно светящихся клеток не только растений, но и других организмов, например

дрожжей и млекопитающих. Ферменты, отвечающие за биосинтез кофейной кислоты из L-тирозина в две стадии, известны (PAL фенилаланинаммияклизидина и C4H циннамат-4-монооксигеназа), как и кодирующие их гены (sam8 и sam5 соответственно) [22]. Присоединение их к кластеру генов люминесцентной системы грибов позволит создать первую полноценную автономную билюминесцентную систему, подходящую для биомиджинга в эукариотических организмах.

ВЫВОДЫ

Широко применяемые сегодня для изучения механизмов распространения и путей лечения различных заболеваний методы билюминесцентного имиджинга обладают рядом неоспоримых достоинств по сравнению с остальными, главным из которых является сверхвысокая чувствительность. Однако недостатком всех используемых люминесцентных систем является необходимость добавления субстрата (люциферина) извне для проведения анализа. Разработка автономной люминесцентной системы эукариот на основе кассеты генов билюминесцентной системы высших грибов является перспективным возможным решением этой проблемы.

Литература

- Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods. Rev.ed. Singapore: World Scientific; 2012.
- Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. Chem Soc Rev. 2016; 45 (21): 6048–77. DOI: 10.1039/c6cs00296j.
- Kiyama M, Saito R, Iwano S, Obata R, Niwa H, A Maki S. Multicolor bioluminescence obtained using firefly luciferin. Curr Top Med Chem. 2016; 16 (24): 2648–55.
- Hirano T. Molecular origin of color variation in firefly (beetle) bioluminescence: A chemical basis for biological imaging. Curr Top Med Chem. 2016; 16 (24): 2638–47.
- Nakajim, Y, Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. Expert Opin Drug Discov. 2010; 5 (9): 835–49. DOI: 10.1517/17460441.2010.506213.
- Sun YQ, Liu J, Wang P, Zhang J, Guo W. D-Luciferin Analogues: a Multicolor Toolbox for Bioluminescence Imaging. Angew Chem Int Ed. 2012 Aug 20; 51 (34): 8428–30. DOI: 10.1002/anie.201203565.
- Guardigli M, Lundin A, Roda A. "Classical" Applications of Chemiluminescence and Bioluminescence. In: Roda A, editor. Chemiluminescence and Bioluminescence: Past, Present and Future. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2010. p. 143–90.
- Tran Q, Lee H, Park J, Kim SH, Park J. Targeting cancer metabolism-revisiting the Warburg effects. Toxicol Res. 2016 Jul; 32 (3): 177–93. DOI: 10.5487/TR.2016.32.3.177.
- Sattler UG, Meyer SS, Quennet V, Hoerner C, Knoerzer H, Fabian C et al. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. Radiother Oncol. 2010 Jan; 94 (1): 102–9. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.11.007.
- Broggini-Tenzer A, Vuong V, Pruschy M. Metabolism of tumors under treatment: mapping of metabolites with quantitative bioluminescence. Radiother Oncol. 2011 Jun; 99 (3): 398–403. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.05.041.
- Slavine NV, McColl RW. Semi-automated Image Processing for Preclinical Bioluminescent Imaging. J Appl Bioinforma Comput Biol. 2015; 4 (1). pii: 114. DOI: 10.4172/2329-9533.1000114.
- England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. Bioconj Chem. 2016 May 18; 27 (5): 1175–87. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00112.
- Schaub FX, Reza MS, Flaveny CA, Li W, Musicant AM, Hoxha S et al. Fluorophore-NanoLuc BRET reporters enable sensitive in vivo optical imaging and flow cytometry for monitoring tumorigenesis. Cancer Res. 2015 Dec 1; 75 (23): 5023–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3538.
- Kamkaew A, Sun H, England CG, Cheng L, Liu Z, Cai W. Quantum dot–NanoLuc bioluminescence resonance energy transfer enables tumor imaging and lymph node mapping in vivo. Chem Commun. 2016 May 19; 52 (43): 6997–7000. DOI: 10.1039/c6cc02764d.
- Hsu CY, Chen CW, Yu HP, Lin YF, Lai PS. Bioluminescence resonance energy transfer using luciferase-immobilized quantum dots for self-illuminated photodynamic therapy. Biomaterials. 2013 Jan; 34 (4): 1204–12. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.0844.
- Kim YR, Kim S, Choi JW, Choi SY, Lee SH, Kim H et al. Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer. Theranostics 2015; 5(8): 805.
- Gupta RK, Patterson SS, Ripp S, Simpson ML, Sayler GS. Expression of the Photobacterium luminescens lux genes (luxA, B, C, D, and E) in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res. 2003 Dec; 4 (3): 305–13.
- Close DM, Patterson SS, Ripp S, Baek SJ, Sanseverino J, Sayler GS. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (lux) in a mammalian cell line. PLoS one. 2010; 5(8): e12441.
- 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. DOI: 10.1002/anie.201501779.
- Kaskova ZM, Dörr FA, Petushkov VN, Purtov KV, Tsarkova AS, Rodionova NS et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. Sci Adv. 2017 Apr 26; 3 (4): e1602847. DOI: 10.1126/sciadv.1602847.
- Oba Y, Suzuki Y, Martins GN, Carvalho, RP, Pereira TA, Waldenmaier HE et al. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. Photochem Photobiol Sci. 2017 Sep 13; 16 (9): 1435–40. DOI: 10.1039/c7pp00216e.

22. Berner M, Krug D, Bihlmaier C, Vente A, Müller R, Bechthold A. Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the

actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J Bacteriol.* 2006 Apr; 188 (7): 2666–73. DOI: 10.1128/JB.188.7.2666-2673.2006.

References

1. Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods. Rev.ed. Singapore: World Scientific; 2012.
2. Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem Soc Rev.* 2016; 45 (21): 6048–77. DOI: 10.1039/c6cs00296j.
3. Kiyama M, Saito R, Iwano S, Obata R, Niwa H, A Maki S. Multicolor bioluminescence obtained using firefly luciferin. *Curr Top Med Chem.* 2016; 16 (24): 2648–55.
4. Hirano T. Molecular origin of color variation in firefly (beetle) bioluminescence: A chemical basis for biological imaging. *Curr Top Med Chem.* 2016; 16 (24): 2638–47.
5. Nakajim, Y, Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5 (9): 835–49. DOI: 10.1517/17460441.2010.506213.
6. Sun YQ, Liu J, Wang P, Zhang J, Guo W. D-Luciferin Analogues: a Multicolor Toolbox for Bioluminescence Imaging. *Angew Chem Int Ed.* 2012 Aug 20; 51 (34): 8428–30. DOI: 10.1002/anie.201203565.
7. Guardigli M, Lundin A, Roda A. "Classical" Applications of Chemiluminescence and Bioluminescence. In: Roda A, editor. *Chemiluminescence and Bioluminescence: Past, Present and Future.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2010. p. 143–90.
8. Tran Q, Lee H, Park J, Kim SH, Park J. Targeting cancer metabolism-revisiting the Warburg effects. *Toxicol Res.* 2016 Jul; 32 (3): 177–93. DOI: 10.5487/TR.2016.32.3.177.
9. Sattler UG, Meyer SS, Quennet V, Hoerner C, Knoerzer H, Fabian C et al. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol.* 2010 Jan; 94 (1): 102–9. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.11.007.
10. Broggini-Tenzer A, Vuong V, Pruschy M. Metabolism of tumors under treatment: mapping of metabolites with quantitative bioluminescence. *Radiother Oncol.* 2011 Jun; 99 (3): 398–403. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.05.041.
11. Slavine NV, McColl RW. Semi-automated Image Processing for Preclinical Bioluminescent Imaging. *J Appl Bioinforma Comput Biol.* 2015; 4 (1). pii: 114. DOI: 10.4172/2329-9533.1000114.
12. England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Bioconj Chem.* 2016 May 18; 27 (5): 1175–87. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00112.
13. Schaub FX, Reza MS, Flaveny CA, Li W, Musicant AM, Hoxha S et al. Fluorophore-NanoLuc BRET reporters enable sensitive in vivo optical imaging and flow cytometry for monitoring tumorigenesis. *Cancer Res.* 2015 Dec 1; 75 (23): 5023–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3538.
14. Kamkaew A, Sun H, England CG, Cheng L, Liu Z, Cai W. Quantum dot–NanoLuc bioluminescence resonance energy transfer enables tumor imaging and lymph node mapping in vivo. *Chem Commun.* 2016 May 19; 52 (43): 6997–7000. DOI: 10.1039/c6cc02764d.
15. Hsu CY, Chen CW, Yu HP, Lin YF, Lai PS. Bioluminescence resonance energy transfer using luciferase-immobilized quantum dots for self-illuminated photodynamic therapy. *Biomaterials.* 2013 Jan; 34 (4): 1204–12. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.0844.
16. Kim YR, Kim S, Choi JW, Choi SY, Lee SH, Kim H et al. Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer. *Theranostics* 2015; 5(8): 805.
17. Gupta RK, Patterson SS, Ripp S, Simpson ML, Sayler GS. Expression of the *Photobacterium luminescens lux* genes (*luxA*, *B*, *C*, *D*, and *E*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2003 Dec; 4 (3): 305–13.
18. Close DM, Patterson SS, Ripp S, Baek SJ, Sanseverino J, Sayler GS. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLoS one.* 2010; 5(8): e12441.
19. 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. DOI: 10.1002/anie.201501779.
20. Kaskova ZM, Dörr FA, Petushkov VN, Purtov KV, Tsarkova AS, Rodionova NS et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Sci Adv.* 2017 Apr 26; 3 (4): e1602847. DOI: 10.1126/sciadv.1602847.
21. Oba Y, Suzuki Y, Martins GN, Carvalho, RP, Pereira TA, Waldenmaier HE et al. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochem Photobiol Sci.* 2017 Sep 13; 16 (9): 1435–40. DOI: 10.1039/c7pp00216e.
22. Berner M, Krug D, Bihlmaier C, Vente A, Müller R, Bechthold A. Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J Bacteriol.* 2006 Apr; 188 (7): 2666–73. DOI: 10.1128/JB.188.7.2666-2673.2006.

РАЗРАБОТКА МЕРОПРИЯТИЙ ПО РЕАБИЛИТАЦИИ ПАЦИЕНТОВ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ НИЖНЕГО АЛЬВЕОЛЯРНОГО НЕРВА

И. С. Копецкий¹, Д. А. Еремин¹, Н. В. Полунина², В. С. Полунин² ✉, Г. Н. Буслаева², А. К. Хетагурова²

¹ Кафедра терапевтической стоматологии, стоматологический факультет
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва

² Кафедра общественного здоровья и здравоохранения, экономики здравоохранения, педиатрический факультет
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва,

Среди повреждений костей лицевого скелета переломы нижней челюсти встречаются часто. Наиболее распространенной локализацией переломов нижней челюсти при которых происходит травма нижнего альвеолярного нерва (НАН), являются угол и тело, в толще которых проходит НАН. Пациенты челюстно-лицевых стационаров имеют низкую медицинскую и социальную грамотность, поэтому целью исследования явилось повышение эффективности лечения больных с переломами нижней челюсти, сопровождающимися травмой НАН, путем внедрения нового комплекса фармакологических препаратов — Мексикора и Комбилипена, ранее не использовавшихся в челюстно-лицевой хирургии, и медико-социальных мероприятий, направленных на формирование мотивации к ведению здорового образа жизни у пациентов.

Ключевые слова: перелом нижней челюсти, повреждение нижнего альвеолярного нерва, социальная реабилитация, здоровый образ жизни, Мексикор, Комбилипен

✉ Для корреспонденции: Полунин Валерий Сократович
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; lunapol@yandex.ru

Статья получена: 14.11.2017 Статья принята к печати: 16.02.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.007

REHABILITATION OF PATIENTS WITH INFERIOR ALVEOLAR NERVE INJURIES

Kopetsky IS¹, Eremin DA¹, Polunina NV², Polunin VS² ✉, Buslaeva GN², Khetagurova AK²

¹ Department of Dental Therapy, Faculty of Dentistry
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Department of Public Health, Healthcare and Healthcare Economics, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Mandibular fractures are a common type of injuries of the facial bones. Most of them affect the angle and body of the mandible in the areas innervated by the inferior alveolar nerve (IAN). Inpatients of maxillofacial units often lack health literacy; therefore, the aim of our study was to improve the effect of treatment in patients with mandibular fractures and IAN injuries by motivating patients toward a healthy lifestyle and by pioneering the use of therapeutic agents Mexicor and Combilipen in the standard regimen.

Keywords: mandibular fracture, inferior alveolar nerve injury, rehabilitation, healthy lifestyle, Mexicor, Combilipen

✉ Correspondence should be addressed: Valery Polunin
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; lunapol@yandex.ru

Received: 14.11.2017 Accepted: 16.02.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.007

В последние годы отмечается увеличение количества больных с травмами костей лицевого скелета, характеризующимися в основном множественными переломами и сочетанными повреждениями и полученными в результате дорожно-транспортных происшествий, противоправных действий третьих лиц, спортивных соревнований и др. [1]. Переломы нижней челюсти среди них составляют по данным зарубежных и отечественных авторов до 87%, практически во всех случаях наблюдается повреждение нижнеальвеолярного нерва (НАН) [2, 3]. Травма НАН происходит вследствие ушиба, растяжения, сдавления костными фрагментами нижней челюсти. В результате травмы растяжение отмечается в 70,1%, контузия (ушиб) — в 16,8%, неполный разрыв — в 12,5% и полный разрыв — в 0,6% случаев [4]. При повреждении НАН выделяют субклиническую, легкую, среднюю, средне-тяжелую и тяжелую степени повреждения [5, 6]. Независимо от вида повреждения периферического нерва

наблюдаются нейротрофические изменения в тканях, которые он иннервирует: нарушение процессов остеорепаляции в зоне перелома, дефицит чувствительности в зоне иннервации. Во всех случаях отмечается болевой синдром, который является основным проявлением этого вида патологии [7, 8]. Коррекция нарушений здоровья у данной категории пациентов проводится в челюстно-лицевых стационарах и кабинетах реабилитации, существующих при них, после выписки из стационара. Коррекция включает хирургические мероприятия в виде иммобилизации костных фрагментов и накожного остеосинтеза при наличии выраженного смещения костных фрагментов и консервативную медикаментозную терапию [9, 10, 11, 12, 13].

Кроме того, показана необходимость проведения не только мероприятий по медицинской реабилитации у больных с переломами нижней челюсти, но и социально-психологических мероприятий, направленных на

формирование мотивации у больных к ведению здорового образа жизни и повышение медицинской грамотности [14, 15].

Несвоевременная диагностика, отложенная иммобилизация или показанное оперативное лечение, неэффективная медикаментозная терапия, несоблюдение пациентом рекомендаций и отсутствие стремления к здоровому образу жизни способствуют возникновению необратимых изменений НАН. Такие изменения приводят к нарушению консолидации костных фрагментов, развитию воспаления, утрате чувствительности и двигательной способности мышц в зоне иннервации нерва. Все это обусловило необходимость разработки мероприятий комплексной реабилитации данной категории пациентов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 212 мужчин. Критерии включения: возраст от 19 до 63 лет, наличие односторонних переломов нижней челюсти, отсутствие выраженных сопутствующих заболеваний, поступление в стационар ГКБ №1 им. Н. И. Пирогова, г. Москвы в период 2011–2016 гг. в первые сутки от момента получения травмы. Критерии исключения: наличие выраженных сопутствующих соматических заболеваний, воспалительных явлений и множественных переломов нижней челюсти. Все пациенты, подписывали информированное согласие, дизайн исследования одобрен на заседании этического комитета РГМУ им. Н. И. Пирогова, протокол №107 от 18.04.2011 г. После выписки из стационара наблюдение проводилось в кабинете реабилитации амбулаторных пациентов. В процессе лечения проводилось анкетирование с целью выявления медико-социальных характеристик пациентов, работа с психологом.

Всем больным при поступлении проводили иммобилизацию ортопедическими конструкциями, по показаниям выполняли удаление зубов из щели перелома. При подозрении на черепно-мозговую травму назначалось обследование у невролога или нейрохирурга, а также для исключения и выявления сопутствующей патологии — у терапевта, травматолога, оториноларинголога. При отсутствии эффекта от двучелюстного шинирования, нарушении прикуса, выполняли операцию остеосинтеза нижней челюсти с использованием титановых пластин. Медикаментозная терапия заключалась в назначении антибактериальных препаратов (линкомицин 2,0 мл в/м 2 раза в день, цефазолин 1 г в/м 2 раза в день) для предупреждения воспалительных осложнений, анальгетиков (Диклофенак 2,0 мл в/м 2 раза в день), использовании медикаментозных средств, назначенных другими специалистами, орошения полости рта растворами антисептиков.

Пациенты были распределены на 2 группы. В контрольную группу входили 86 пациентов. Для лечения им были назначены неостигмина метилсульфат (Прозерин, Дальхимфарм, Россия) по 1 мл 0,5%-го раствора в течение месяца, цианокобаламин по 500–1000 мкг чередовали с 5%-м раствором тиамин хлорида по 3 мл, 15–20 инъекций, дибазол по 0,005 г внутрь в течение месяца. В основную группу входили 126 человек. В состав комплексной терапии им были назначены препараты пиридоксин + тиамин + цианокобаламин + [лидокаин] (Комбилипен, ОАО Фамстандарт – УфаВИТА, Россия) и этилметилгидроксипиридина сукцинат (Мексикор, ЭкоФармИнвест, Россия).

Этилметилгидроксипиридина сукцинат применяли в дозировке 150 мг, согласно инструкции, внутримышечно 2 раза в день в течение 14 дней. В дальнейшем препарат применялся в капсулах по 100 мг 2 раза в день в течение 21 дня.

Комбилипен применяли в ампулах по 2 мл внутримышечно 1 раз в день в течение 10 дней. В дальнейшем препарат применяли 3 раза в неделю в течение 3 недель.

Согласно классификации степени тяжести повреждения НАН (Корж А. А., 1989 г.), пациенты основной и контрольной групп были разделены на три группы: первую группу составили пациенты с легкой степенью тяжести повреждения НАН, вторую со средней степенью и в третью вошли пациенты с средне-тяжелой и тяжелой степенями.

Для определения эффективности проводимой терапии были использованы следующие методы:

1. Определение локализации и площади нарушения иннервации, для определения зон электровозбудимости кожи нижней губы и подбородка на стороне повреждения.

Для более точного определения локализации зоны гипо- и парестезии, а также для аргументированной интерпретации результатов проводимой послеоперационной терапии была использована схема: для построения условных квадрантов на лице пациента отмечали три точки: середина расстояния от нижней губы до выступающей части подбородка — точка А, середина расстояния от угла рта до края нижней челюсти — точка В, при соединении этих точек образуется горизонталь. Точка С располагалась на середине расстояния половины нижней губы. Вертикаль, опущенная из точки С, пересекала горизонтальную линию и образовывались 1-я, 2-я, 3-я и 4-я условные зоны [16].

Определение тактильной чувствительности проводили путем раздражения кожи подбородочной области кисточкой или ватным тампоном. При помощи пальпации исследовали глубокую чувствительность указанной области.

Было проведено определение показателей электровозбудимости кожи на стороне повреждения НАН в области нижней губы и подбородка в указанных квадрантах. Данное исследование проводили в первые сутки после поступления, на 10-й день и на 32–40-й день, в момент снятия назубных шин и через 6 месяцев после травмы.

Определение показателей электровозбудимости кожи нижней губы и подбородка проводили следующим образом. Кожу в исследуемой области предварительно обрабатывали 70%-м раствором этилового спирта для дезинфекции и улучшения электрического контакта. Электрод аппарата PARKELL Digitest 2 (Parkell, США) прикладывали к симметричным зонам на лице в месте иннервации НАН в соответствующих квадрантах. Определяли минимальную силу тока, при которой появлялось первое ощущение у пациента (покалывание, пощипывание и т. д.), о котором он сразу сообщал врачу. Электроток подавали в импульсном режиме возрастающей силы от 0 до 160 мкА [17].

Кроме того, объективным критерием распределения на подгруппы являлись показатели электровозбудимости кожи на стороне повреждения НАН. Для стандартизации полученных результатов электровозбудимость измеряли в 3-й зоне. Показатели электровозбудимости, измеряемые у исследуемых пациентов на здоровой стороне, варьировали от 25 до 35 мкА. У пациентов с травмой легкой степени тяжести показатели электровозбудимости кожи в

измеряемых зонах составляли от 35 до 69 мкА, у пациентов с травмой средней степени тяжести — от 70 до 129 мкА, у пациентов с травмой тяжелой степени — от 130 мкА и выше.

2. Изучение социально-гигиенических характеристик пациентов.

Более половины пациентов с переломами нижней челюсти находилось в алкогольном опьянении при поступлении в приемное отделение. Пациенты — водители транспортных средств в 29,8% случаев находились в той или иной степени алкогольного опьянения. Результаты изучения распространенности вредных привычек показали, что 38,4% пациентов злоупотребляют алкоголем. Было выявлено, что среди неработающих пациентов злоупотребляющих алкоголем в 2,3 раза больше (56,6% против 24,6%). Отмечено, что лиц с высшим образованием, злоупотребляющих алкоголем, достоверно ($p < 0,05$) меньше, чем пациентов, имеющих среднее или неполное среднее образование. Коэффициент корреляции между злоупотреблением алкоголем и уровнем образования составил $r = -0,889$ ($m = \pm 0,114$, $p < 0,05$). Отмечено также, что среди анкетированных пациентов курит 70,4%, при этом более половины (50,8%) из числа курящих, считает курение вредной для здоровья привычкой, но не может с ней справиться. Только 3,4% не считают курение вредным для здоровья.

Проведенное анкетирование показало, что среди обследованных 90,0% респондентов наркотические вещества и препараты не принимали ни разу. В то же время 7,1% пациентов пробовали употреблять наркотики, 1,9% больных употребляют их иногда и каждый сотый регулярно. Все они находились в возрасте до 40 лет.

Среди обследованных пациентов с переломами нижней челюсти 44,2% страдают избыточной массой тела, что требует коррекции. Только 13,4% опрошенных контролируют свой вес. Лишний вес и связанное с ним нарушение метаболизма веществ приводят к более поздним срокам консолидации фрагментов костей челюсти, а наличие выраженной жировой клетчатки затрудняет пальпаторную и визуальную диагностику переломов и связанную с ними деформацию челюстно-лицевой области. В ряде случаев подкожно-жировая клетчатка пропитывается кровью, образуются гематомы, которые инфицируются и нагнаиваются. Коэффициент корреляции между указанными признаками составил $r = +0,749$ ($n = \pm 0,114$, $p < 0,05$). Только 9,8% больных руководствуются советами врача, выполняют назначения по нормализации своей массы тела, причем таковых больше среди лиц старшего возраста (возраст более 50 лет).

Масса тела может свидетельствовать не только о характере питания пациента, но и о его отношении к физическим нагрузкам. Отмечено, что более половины опрошенных (59,8%) ведут малоподвижный образ жизни, причем таковых достоверно ($p < 0,05$) в 2,3 раза больше в возрасте старше 50 лет по сравнению с более молодыми (74,4% против 31,1%). В целом три четверти наблюдаемых

пациентов имели минимальную медицинскую активность — редко посещали врача при заболеваниях, не участвовали в диспансерных и профилактических осмотрах, не принимали участие в оздоровительных мероприятиях, не считали нужным выполнять назначения врача в полном объеме и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью аппарата PARKELL Digttest 2 (Parkell, США) были получены данные о состоянии порога возбудимости кожи в исследуемых зонах, которые иннервирует НАН на подбородке и нижней губе. Определение показателей электроодонтодиагностики не проводили, так как у всех пациентов на момент исследования в полости рта находились назубные металлические шины.

Исследование было проведено в двух группах: группе пациентов с переломом нижней челюсти в области угла, которым были назначены Мексикор и Комбилипен, и группе пациентов, в состав терапии которых не включали данные препараты. Исследование проводили на момент поступления пациента в стационар, на 10-е сутки и на 32-40-е сутки, а также по истечении 6 месяцев после травмы.

Установлено, что показатели электровозбудимости кожи в исследованных зонах были выше во 2 и 3 зонах.

При повреждениях легкой степени тяжести НАН средние значения электровозбудимости составляли $55 \pm 1,5$ мкА и $58 \pm 1,5$ мкА. При этом клинические проявления сопровождалось чувством «ползания мурашек» в области нижней губы на стороне повреждения, снижением чувствительности кожи на стороне повреждения. При повреждениях средней степени тяжести значения электровозбудимости варьировались от $109,6 \pm 3,1$ мкА до $121,9 \pm 3,5$ мкА. А при повреждении тяжелой степени тяжести — от $159,5 \pm 4,5$ мкА до $168,1 \pm 4,8$ мкА, что свидетельствует о большем нарушении чувствительности кожи в данных зонах. Клинические проявления повреждения НАН при повреждениях средней и тяжелой степени тяжести проявлялись полной потерей чувствительности кожи в данных зонах, отмечались выраженный болевой синдром, нарушение работы мимических мышц, нарушение чувствительности слизистой оболочки и зубов на стороне повреждения. У 18,6% пациентов отмечались незначительные зоны парестезии нижней губы и подбородка с другой стороны, за счет того, что часть ветвей НАН участвуют в иннервации фронтальной группы зубов, образуя общее сплетение.

Результаты исследования показали, что при повреждениях легкой степени тяжести значения электровозбудимости в 1-й и 4-й зонах основной группы пациентов уменьшились и составили $29,4 \pm 1,4$ мкА и $27,4 \pm 1,5$ мкА соответственно. Это соответствует показателям электровозбудимости на здоровой стороне. Во 2-й и 3-й зонах отмечалась тенденция к снижению показателей электровозбудимости: они составили $40,1 \pm 4,2$ мкА и $42,3 \pm 4,0$ мкА в основной группе, в контрольной группе значения

Таблица 1. Показатели электровозбудимости кожи нижней губы во 2-й и 3-й зоне, на момент поступления, в зависимости от степени тяжести повреждения НАН

Зона определения	Степень тяжести повреждения НАН		
	легкая	средняя	тяжелая
2	$55 \pm 1,5$ мкА	$109,6 \pm 3,1$ мкА	$159,5 \pm 4,5$ мкА
3	$58 \pm 1,5$ мкА	$121,9 \pm 3,5$ мкА	$168,1 \pm 4,8$ мкА

электровозбудимости уменьшились, но в меньшей степени и составили в 1-й зоне $35,1 \pm 1,4$ мкА, во 2-й зоне — $49,6 \pm 4,6$ мкА, в 3-й зоне — $50,8 \pm 4,6$ мкА, 4-й зоне — $36,2 \pm 1,6$ мкА.

При повреждениях средней и тяжелой степени тяжести в основной группе пациентов также наблюдалось снижение значений электровозбудимости кожи на стороне повреждения. Эти показатели были в 1,2–1,3 раза ниже по сравнению с контрольной группой.

В результате анализа данных электровозбудимости кожи в исследованных зонах видно, что при поражениях легкой степени тяжести показатели в основной и контрольной группах равны значениям электровозбудимости на здоровой стороне. Лишь у 15% пациентов контрольной группы чувство «ползания мурашек» сохранилось, у всех остальных пациентов контрольной и основной групп, клинические симптомы повреждения НАН купировались.

При повреждениях средней тяжести наиболее высокие показатели электровозбудимости отмечались во 2-й и 3-й зонах. В среднем они составили $40,5 \pm 3,9$ мкА и $59,7 \pm 3,7$ мкА в основной группе и более высокие показатели были в контрольной группе — $65,1 \pm 5,4$ мкА и $85,7 \pm 5,1$ мкА. Клинические симптомы характеризовались уменьшением зоны парестезии у пациентов основной группы по сравнению с пациентами контрольной группы. У 25% исследуемых пациентов контрольной группы площадь парестезии сохранялась на прежнем уровне.

При повреждениях тяжелой степени тяжести значения показателей электровозбудимости кожи в исследуемых квадрантах в основной группе были в 1,3–1,4 раза меньше, чем значения электровозбудимости у пациентов контрольной группы. У 73% пациентов контрольной группы, клинические симптомы сохранялись на прежнем уровне, тогда как в основной группе отмечалась положительная динамика в виде уменьшения площади парестезии, снижения болевого синдрома. Согласно результатам измерений электровозбудимости, проведенным на 32–40-е сутки лечения, можно сделать вывод, что во всех четырех зонах значения электровозбудимости понизились у пациентов, в состав терапии которых, входили препараты Комбилипен и Мексикор. Выбор препаратов был не случайным: согласно приказу Министерства Здравоохранения №1497н от 24.12.2012 г. «Лечение пациентов при поражении лицевого нерва» в комплексной терапии рекомендовано использовать витамины В1 и В6, В12, а также на основании проведенных многочисленных клинических исследований, которые отражены в отечественной и зарубежной литературе, применение антиоксидантных препаратов играет важнейшую роль в лечении травматических повреждений периферических нервов [18, 19].

Реабилитация больных с переломами нижней челюсти включала проведение социально-психологических и медицинских мероприятий. Полученные результаты показали, что среди пациентов только половина (47,7%) выполнили все лечебные мероприятия в полном объеме, 32,7% — не выполняли рекомендации врача, а 19,6% — выполнили назначения не в полном объеме.

Среди причин, препятствующих выполнению медицинской реабилитации, пациенты называли такие, как отсутствие положительного эффекта от назначений (49,3 случаев), очереди в отделениях больницы и поликлиниках (41,2 случаев), неприятные и болезненные ощущения во время выполнения медицинских процедур (38,7 случаев), отсутствие материальных средств для выполнения предложенных методов лечения (37,6 случаев),

отсутствие мотивации для выполнения рекомендаций (28,4 случаев), отсутствие доверия к медицинскому персоналу (23,0 случая) (в расчете на 100 опрошенных больных). Установлено, что почти половина опрошенных из числа лиц, не выполнивших программу медицинской реабилитации в полном объеме, назвали от 2 до 3 причин, которые, по их мнению, препятствовали проведению полного курса лечения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Показатели электровозбудимости кожи в области иннервации НАН в зоне 2 и 3 на момент поступления составили: при поражениях легкой степени тяжести — $55,5 \pm 1,5$ мкА и $58 \pm 1,5$ мкА; при поражениях средней степени тяжести — $109,6 \pm 3,1$ мкА и $121,9 \pm 3,5$ мкА, при поражениях тяжелой степени тяжести — $159,5 \pm 4,5$ мкА и $168,1 \pm 4,8$ мкА. Через 10 дней после травмы показатели в основной группе уменьшились в 1,2–1,3 раза, по сравнению с показателями в контрольной группе. На 32–40-е сутки значения электровозбудимости составили: при поражениях средней тяжести $40,5 \pm 3,9$ мкА и $59,7 \pm 3,7$ мкА, а в контрольной группе — $65,1 \pm 5,4$ мкА и $85,7 \pm 5,1$ мкА; при поражениях тяжелой степени значения были в 1,3–1,4 раза меньше, чем в контрольной группе. Отмечалось сохранение клинической симптоматики у 73% пациентов контрольной группы на прежнем уровне, тогда как в основной группе наблюдалась положительная динамика в виде уменьшения площади парестезии, снижения болевого синдрома.

Результаты исследования показали, что у пациентов с поражениями легкой и средней степенями тяжести повреждения НАН показатели электровозбудимости не превышали значений нормы. Клинические симптомы травмы НАН, такие как чувство онемения кожи нижней губы, боль при пальпации нижней губы и нарушение чувствительности слизистой на стороне повреждения, полностью купировались.

При повреждениях тяжелой степени тяжести в основной группе пациентов показатели электровозбудимости во всех исследуемых зонах тоже не превышали показатели нормы. Однако в контрольной группе у 12 пациентов показатели электровозбудимости были повышены во 2-й и 3-й зонах и составили $45,1 \pm 3,2$ мкА и $43,2 \pm 3,1$ мкА соответственно. Это характерно для клинической симптоматики, которая проявлялась, чувством онемения и ползания «мурашек» во 2-й и 3-й зонах пациентов контрольной группы.

На основании определения показателей электровозбудимости кожи подбородка и нижней губы на стороне повреждения было выявлено, что площадь участка парестезии в области нижней губы, угла рта, кожи подбородка, десен на стороне повреждения, к 32–40 дню уменьшилась у 103 пациентов по сравнению с контрольной группой и захватывала только две зоны — 2 и 3. Благодаря влиянию Мексикора на микроциркуляцию отек мягких тканей на стороне повреждения у 74 пациентов, принимавших в составе комплексной терапии данный препарат, на 3-й день лечения был значительно меньше выражен.

Важнейшим направлением явилась санитарно-просветительная работа по внедрению в повседневную жизнедеятельность пациентов элементов здорового образа жизни. В итоге проведенного исследования было выявлено, что ведущую роль в формировании неблагоприятных показателей здоровья у исследуемых является низкий

уровень медицинской активности большей части обследованных. Рекомендации по коррекции медицинской активности были направлены на внедрение элементов здорового образа жизни и изменение медицинского поведения среди пациентов с травмой НАН. Это позволило увеличить удельный вес пациентов, внедривших правила рационального питания (с 13,6% до 36,2%), нормализовавших сон (с 16,1% до 30,0%), повысивших физическую активность (с 12,6% до 23,2%), отказавшихся от курения (11,0%).

ВЫВОДЫ

На основании измерений электровозбудимости, проведенных на 32–40-е сутки лечения, можно сделать вывод, что во всех четырех зонах при повреждении средней и тяжелой степеней тяжести значения электровозбудимости понизились у пациентов, в состав терапии которых входили препараты Комбилипен и Мексикор.

Площадь парестезии у пациентов основной группы также уменьшилась и захватывала только 2 и 3 зоны, тогда как в контрольной группе она распространялась на 1, 2 и 3 зоны. На основании этого можно заключить, что применение Комбилипена и Мексикора в комплексном лечении больных с повреждением НАН позволяет ускорить регенерацию поврежденного нервного волокна и уменьшить клинические симптомы повреждения НАН.

Проведение реабилитационных мероприятий по повышению качества жизни и медицинской активности положительно способствовало изменению характера медицинского поведения, нормализации психоэмоционального фона, формированию здорового образа жизни. С увеличением доли больных, вовлеченных в различные виды реабилитации, увеличилась численность пациентов, считающих необходимым руководствоваться назначением врача на 31,2%. Это привело к увеличению в 2,9 раза числа больных с повреждениями НАН, восстановивших функции челюстно-лицевой области в полном объеме.

Литература

1. Копецкий И. С., Притыко А. Г., Полунина Н. В., Насибуллин А. М. Травматизм челюстно-лицевой области среди населения. РМЖ. 2009; 6: 3–6.
2. Celeste RK. Illegal drug use is associated with postoperative complications in persons with mandibular fractures. J Evid Based Dent Pract. 2009; 9: 227–8.
3. Корж Г. М. Диагностика и лечение повреждений нижнего альвеолярного нерва при переломах нижней челюсти и стоматологических манипуляциях [диссертация]. Смоленск: 1989.
4. Тимофеев А. А., Леснухин В. Л. Изучение состояния нижнего альвеолярного нерва при повреждениях нижней челюсти в динамике проводимого лечения. Часть 1. Современная стоматология. 2009; 3: 109–15.
5. Морозова М. Н., Шаблий Д. Н., Джерелей А. А. К вопросу о диагностике степени тяжести травматического неврита нижнего альвеолярного нерва. Вестник проблем биологии и медицины. 2013; 2 (100): 314–8.
6. Скуридина, Е. П. Клинико-диагностические критерии невралгии тройничного нерва. [диссертация]. М.: 2006.
7. Левенец А. А., Григорьян А. С. К патогенезу посттравматических деформаций нижней челюсти растущего организма. Стоматология. 2000; 1: 20–5.
8. Baker B, Gibbons S, Woods M. Intra-alveolar distraction osteogenesis in preparation for dental implant placement combined with orthodontic/orthognathic surgical treatment: A case report. Australian Dental Journal. 2003; 48: 65–8.
9. Копылов А. В., Сирак С. В., Копылова И. А. и др.. Комплексное лечение одонтогенных травм нижнего альвеолярного нерва. Современные проблемы науки и образования. 2013; 4. URL: www.science-education.ru/111-10132.
10. Горбонос И. А. Осложнения при остеосинтезе переломов нижней челюсти и их профилактика [диссертация]. Новосибирск: 2007.
11. Боднева С. Л., Пузин М. Н., Кипарисова Е. С. Комплексная терапия одонтогенного неврита луночковых нервов. Клиническая неврология. 2010; 1: 14–7.
12. Иващенко Н. И., Ипполитов В. П. Остеосинтез в лечении тяжелых сочетанных черепно-лицевых травм у юношей. Клиническая стоматология. 2007; 3: 56–9.
13. Jungel P. Paresthesia of infraorbital nerve following fracture of zygomatic complex. J Oral Maxillofac Surg. 1987; 16 (3): 362–7.
14. Полунин В. С., Дубровин М. С., Копецкий И. С. Медико-социальная характеристика больных с повреждениями челюстно-лицевой области. Вестник Росздравнадзора. 2013; 2: 46–9.
15. Копецкий И. С., Насибуллин А. М. Медико-социальная характеристика больных с тяжелыми сочетанными повреждениями средней зоны лица и особенности оказания им медицинской помощи в условиях реанимационного отделения. РМЖ. 2012; 2: 3–7.
16. Григорьянц Л. А. Сирак С. В., Копылова И. А., Елизаров А. В. Хирургическое лечение одонтогенных компрессионных травм нижнего альвеолярного нерва после эндодонтических вмешательств. Эндодонтия today. 2013; 4: 53–8.
17. Сирак С. В. Клинико-анатомическое обоснование лечения и профилактики травм нижнеальвеолярного нерва, вызванных выведением пломбировочного материала в нижнечелюстной канал [диссертация]. М.: 2006.
18. Белоусов А. Е. Пластическая, реконструктивная и эстетическая хирургия. СПб.: Гиппократ; 1998. 774 с.
19. Kurtoglu Z. et. al. Effect of trypidil after crush injury to a peripheral nerve. Acta Med Okayama. 2005; 59 (2): 37–44.

References

1. Kopetskiy IS, Prityko AG, Polunina NV, Nasibullin AM. Travmatizm chelyustno-litsevoy oblasti sredi naseleniya. RMZh. 2009; 6: 3–6.
2. Celeste RK. Illegal drug use is associated with postoperative complications in persons with mandibular fractures. J Evid Based Dent Pract. 2009; 9: 227–8.
3. Korzh GM. Diagnostika i lechenie povrezhdeniy nizhnego al'veolyarnogo nerva pri perelomakh nizhney chelyusti i stomatologicheskikh manipulyatsiyakh: avtoref [dissertatsiya]. Smolensk: 1989.
4. Timofeev AA, Lesnukhin VL. Izuchenie sostoyaniya nizhnego al'veolyarnogo nerva pri povrezhdeniyakh nizhney chelyusti v dinamike provodimogo lecheniya. Chast' 1. Sovremennaya stomatologiya. 2009; 3: 109–15.
5. Morozova MN, Shabliy DN, Dzhereley AA. K voprosu o diagnostike stepeni tyazhesti travmaticheskogo nevrita nizhnego al'veolyarnogo nerva. Vestnik problem biologii i meditsiny. 2013; 2 (100): 314–18.
6. Skuridina EP. Kliniko-diagnosticheskie kriterii nevralgii

- troynichnogo nerva [dissertatsiya]. M.: 2006.
7. Levenets AA, Grigor'yan AS. K patogenezu posttravmaticheskikh deformatsiy nizhney chelyusti rastushchego organizma. Stomatologiya. 2000; 1: 20–5.
 8. Baker B, Gibbons S, Woods M. Intra-alveolar distraction osteogenesis in preparation for dental implant placement combined with orthodontic/orthognathic surgical treatment: A case report. Australian Dental Journal. 2003; 48: 65–8.
 9. Kopylov AV, Sirak SV, Kopylova IA i dr. Kompleksnoe lechenie odontogennykh travm nizhnego al'veolyarnogo nerva. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2013; 4. URL: www.science-education.ru/111-10132.
 10. Gorbonos IA. Oslozhneniya pri osteosinteze perelomov nizhney chelyusti i ikh profilaktika [dissertatsiya]. Novosibirsk: 2007.
 11. Bodneva SL, Puzin MN, Kiparisova ES i dr. Kopmleksnaya terapiya odontogennogo nevritya lunochkovykh nervov. Klinicheskaya nevrologiya. 2010; 1: 14–7.
 12. Ivashchenko NI, Ippolitov VP. Osteosintez v lechenii tyazhelykh sochetannykh cherepno-litsevykh travm u yunoshey. Klinicheskaya stomatologiya. 2007; 3: 56–9.
 13. Jungel P. Parasthesia of infraorbital nerve following fracture of zygomatic complex. J Oral Maxillofac Surg. 1987; 16 (3): 362–7.
 14. Polunin VS, Dubrovin MS, Kopetskiy IS. Mediko-sotsial'naya kharakteristika bol'nykh s povrezhdeniyami chelyustno-litsevoy oblasti. Vestnik Roszdravnadzora. 2013; 2: 46–9.
 15. Kopetskiy IS, Nasibullin AM. Mediko-sotsial'naya kharakteristika bol'nykh s tyazhelymi sochetannymi povrezhdeniyami sredney zony litsa i osobennosti okazaniya im meditsinskoy pomoshchi v usloviyakh reanimatsionnogo otdeleniya. RMZh. 2012; 2: 3–7.
 16. Grigoryants LA, Sirak SV, Kopylova IA, Elizarov AV. Khirurgicheskoe lechenie odontogennykh kompressionnykh travm nizhnego al'veolyarnogo nerva posle endodonticheskikh vmeshatel'stv. Endodontiya today. 2013; 4: 53–8.
 17. Sirak SV. Kliniko-anatomicheskoe obosnovanie lecheniya i profilaktiki travm nizhneal'veolyarnogo nerva, vyzvannykh vyvedeniem plombirovochnogo materiala v nizhnechelyustnoy kanal [dissertatsiya]. M.: 2006.
 18. Belousov AE. Plasticheskaya, rekonstruktivnaya i esteticheskaya khirurgiya. SPb.: Gippokrat, 1998. 774 p.
 19. Kurtoglu Z et al. Effect of trapidil after crush injury to a peripheral nerve. Acta Med Okayama. 2005; 59 (2): 37–44.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕДАВНО ПОЛУЧЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ АКРОМИАЛЬНО-КЛЮЧИЧНОГО СОЧЛЕНЕНИЯ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ ДВУХПУЧКОВОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ

К. А. Егiazарян¹, Г. Д. Лазишвили¹, А. П. Ратьев¹, Э. Р. Шукюр-Заде¹ ✉

¹ Кафедра травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

Вывихи акромиального конца ключицы (АКК) составляют более 26% всех вывихов, 11% всех случаев спортивных травм, более 10% всех случаев острых травм плечевого пояса, занимая третье место после вывихов в локтевом и лучезапястном суставах. Большинство техник оперативного лечения недавно полученных (свежих) повреждений акромиально-ключичного сочленения (АКС) не учитывают анатомию и биомеханику сочленения, в связи с чем в послеоперационном периоде у пациентов сохраняется один из возможных в этом сочленении видов нестабильности (горизонтальная или вертикальная нестабильность). Целью нашего исследования было разработать высокоэффективную методику оперативного лечения недавно полученных повреждений, позволяющую восстановить функцию АКС в ранние сроки. Представлены результаты оперативного лечения методом малоинвазивной динамической реконструкции АКС у 112 пациентов со свежими вывихами АКК. В 111 (99,1%) случаях получен хороший результат. Использование предложенного метода позволяет не нарушать биомеханику сочленения, полностью восстановить анатомию и в кратчайшие сроки получить хороший функциональный результат.

Ключевые слова: вывих ключицы, акромиально-ключичное сочленение, АКС, двухпучковая фиксация, недавно полученные повреждения

✉ **Для корреспонденции:** Шукюр-Заде Эмиль Рашидович
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; doktoremil@mail.ru

Статья получена: 20.11.2017 **Статья принята к печати:** 10.02.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.013

REPAIR OF FRESH INJURIES TO THE ACROMIOCLAVICULAR JOINT BY DOUBLE-BUNDLE RECONSTRUCTION

Egiazaryan KA¹, Lazishvili GD¹, Ratiev AP¹, Shukyr-Zade ER¹ ✉

¹ Department of Traumatology, Orthopedics and Field Surgery,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Dislocation of the lateral end of the clavicle (LEC) constitutes over 26% of all dislocations, 11% of sports injuries and over 10% of acute injuries to the shoulder girdle, ranking 3rd after elbow and wrist joints dislocations. The majority of surgical techniques used to repair fresh injuries to the acromioclavicular joint (ACJ) do not account for its anatomy and biomechanics, resulting in postoperative instability of the joint in both vertical and horizontal planes. The aim of this study was to propose a highly effective technique for the surgical treatment of acute injuries to ACJ ensuring a better recovery of its function. Below we present the results of 112 patients who underwent minimally invasive acromioclavicular joint reconstruction. The outcome was very good in 111 patients (99.1%). The proposed technique helps to avoid damage to the biomechanics of the joint and to fully restore its anatomy within short time.

Keywords: dislocation of the clavicle, acromioclavicular joint, double-bundle reconstruction, fresh injury

✉ **Correspondence should be addressed:** Emil Shukyr-Zade
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; doktoremil@mail.ru

Received: 20.11.2017 **Accepted:** 10.02.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.013

Вывихи акромиального конца ключицы (АКК) составляют более 26% всех возникающих вывихов [1]. Социальную важность повреждения АКК обуславливает тот факт, что подавляющее большинство пациентов — это лица, активно, в том числе профессионально, занимающиеся спортом, а также социально активное население в возрасте от 25 до 45 лет.

Одной из основных причин неудовлетворительных исходов лечения недавно полученных вывихов АКК, является запоздалая и неполная диагностика. Но даже при ранней диагностике вывихов АКК, до сих пор обсуждаются вопросы выбора метода лечения [2]. Рекомендации нередко носят не только противоречивый, но и взаимоисключающий характер: от признания необходимости восстановительных

операций в остром периоде травмы, до отказа от оперативного лечения даже в случаях полного вывиха АКК.

В литературе описано более 200 консервативных и оперативных методов лечения вывихов АКК [3]. Это многообразие обусловлено анатомо-биомеханическими особенностями АКС, выполняющего роль «подвески» верхней конечности [4]. Количество неудовлетворительных исходов оперативного лечения также остается достаточно высоким, что во многом связано с использованием давно принятых хирургических методик, не учитывающих биомеханику сустава [5].

Многие исследования убедительно доказывают, что основную нагрузку АКС несет клювовидно-ключичная связка [6]. Как известно, клювовидно-ключичная связка имеет

двухпучковую структуру и состоит из двух связок: трапециевидной и конической. Эти связки идут под углом друг к другу, формируя уникальный биомеханический комплекс АКК [7, 8]. Исходя из этого, считаем, что успехом оперативного лечения при вывихе АКК является восстановление обоих пучков клювовидно-ключичной связки.

В последнее время определились новые пути лечения вывихов АКК — с помощью аппаратов внешней фиксации, стягивающих устройств с памятью формы, малоинвазивных методов и др. Однако, несмотря на большое многообразие методик оперативного лечения вывихов АКК, выбор метода оперативного лечения во многом зависит от предпочтений оперирующего хирурга.

Аппаратные методы фиксации вывихов АКК вызывают серьезные неудобства для пациентов. Натяжение спиц нередко ведет к неуправляемой гиперкоррекции АКК, что способствует рецидиву вывиха. Сложная хирургическая техника ограничивает их применение.

Фиксация АКК спицами и проволоочной петлей по Weber часто приводила к рецидиву вывиха. Типичные осложнения этой методики — миграция и деформация спиц, разрыв проволоки [9].

Широко распространенный в настоящее время метод фиксации АКК крючковидной пластиной ригиден, высоко травматичен, требует повторной операции по удалению импланта. Отмечена высокая частота рецидива вывиха АКК, миграция и перелом фиксатора [10]. Хроническая травматизация акромиального отростка лопатки пластиной с выраженным болевым синдромом и ограничением движений в плечевом суставе нередко создает благоприятные условия для возникновения артроза акромиально-ключичного сочленения (18,1%) и развития субакромиального импиджмента (8,76–37,5%), остеолита акромиального отростка лопатки (2,56–30,3%), остеоартроза АКК (18,1%) [11, 12, 13].

Методики фиксации АКК с использованием нитей тоже не лишены недостатков: расположение серкляжа в переднем отделе клювовидного отростка может привести к неполному вывиху ключицы вперед, вращательные движения ключицы приводят к перерезанию кости нитью, проведение нитей связано с большой травматизацией.

Несмотря на преимущества артроскопических операций, многие травматологи по-прежнему отдают предпочтение давно применяемым методикам стабилизации ключицы, так как артроскопические операции требуют от врача специальные навыки и техническую оснащенность операционной. При использовании артроскопической техники необходимо проведение обширного дебримента нижней поверхности клювовидного отростка, что может привести к дополнительному повреждению остатков клювовидно-ключичной связки и нервно-сосудистых структур, расположенных в данной области. Однако такие методики позволяют точно позиционировать туннель в клювовидном отростке лопатки.

В настоящее время приоритетом в лечении вывиха АКК является анатомическое восстановление связочного аппарата АКК [14, 15, 16, 17].

На современном этапе развития хирургии АКК остаются предпочтительными малоинвазивные методики [18, 19, 20], среди которых одной из наиболее перспективных является методика MINAR (Minimally Invasive Acromioclavicular Joint Reconstruction) [21]. Данная методика была разработана профессором Wolf Petersen с соавторами, работающими в госпитале Мартина Лютера в Берлине. При операции используются фиксаторы Flipptack (KARL STORZ GmbH & Co, Германия) и нити Ethibond 2.0 (Johnson & Johnson company, США). Принцип метода заключается в фиксации АКК одним пучком, который стабилизирует и удерживает дистальный отдел ключицы во вправленном состоянии, что в свою очередь создает условия для самостоятельного сращения клювовидно-ключичной связки. На клинических базах кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии РНИМУ им. Н. И. Пирогова с 2009 г., где применяется данная методика, проведен анализ исходов лечения 156 пациентов. В 78% случаев у пациентов с IV и V типами вывиха по классификации Rockwood [22] была выявлена сохраняющаяся горизонтальная нестабильность, что и подтолкнуло нас на разработку малоинвазивной динамической двухпучковой методики реконструкции АКК, позволяющей полностью восстановить анатомию АКК, замещая обе порции клювовидно-ключичной связки. Целью исследования было разработать современную высокоэффективную систему хирургического лечения больных с недавно полученными вывихами АКК с использованием малоинвазивной реконструкции АКК, направленную на быстрое восстановление функции плечевого сустава.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

За период с 2011 по 2017 годы на клинических базах кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии РНИМУ им. Н. И. Пирогова (ГКБ № 1 им. Н. И. Пирогова и ГКБ № 64) находились на лечении 112 пациентов со свежими повреждениями АКК, которым в ходе оперативного лечения была применена малоинвазивная динамическая двухпучковая реконструкция АКК (патент RU 2017112434 от 19.10.2017). Критерии включения в исследование: мужчины и женщины от 18 до 70 лет (табл. 1), получившие не более 3–7 дней назад бытовую, спортивную травму или травму при ДТП (табл. 2), диагностированную клинически, рентгенологически и оцененную по классификации вывихов АКК по Rockwood (1984 г.), наиболее полно и достоверно отражающей характер повреждения связочных стабилизаторов и степень смещения акромиального конца ключицы (рис. 1). Критерии исключения: мужчины и женщины иного возраста, с травмами, полученными более 3–7 дней назад, не соответствующие другим критериям

Таблица 1. Распределение больных по полу и возрасту

Возраст/Пол	Муж	Жен	Всего
До 18 лет	2	0	2 (1,8%)
19–30 лет	58	3	61 (54,5%)
31–40 лет	40	2	42 (37,5%)
41–50 лет	4	1	5 (4,5%)
51–60 лет	1	0	1 (0,9%)
61–70 лет	1	0	1 (0,9%)
ИТОГО:	112		112 (100%)

Таблица 2. Распределение больных по виду травматизма и механизму повреждения

Вид травматизма	Механизм травмы	Количество пациентов
Бытовой	прямой	19
	непрямой	18
Спортивный	прямой	44
	непрямой	27
ДТП	прямой	4
	непрямой	0
ВСЕГО:		112

включения. Комплексное использование дополнительных методов исследования, включая УЗИ, МРТ, КТ, позволяли в дооперационном периоде объективно оценить степень повреждения, а также оценить послеоперационное течение (рис. 2).

Статистический анализ результатов исследования выполняли с помощью статистической программы «Statistica 10».

Техника операции

Основа метода состоит в фиксации ключицы к лопатке двумя системами «опорная площадка — нить», расположение и ход которых повторяют анатомически порции клювовидно-ключичной связки (коническую и трапецевидную связки).

1. Формирование кожного разреза и моделирование хирургического доступа. Отступив на 2–3 см от акромиально-ключичного сустава, создавали вертикальный кожный разрез по типу «сабельного удара» длиной не более 3 см в проекции клювовидно-ключичной связки. Линия разреза должна захватывать 2/3 ключицы и идти на 1 см кпереди от ключицы по направлению к верхушке клювовидного отростка.

2. Тупым и острым путем выполняли расслаивание дельтовидной мышцы, пальпировали клювовидный отросток в проекции места прикрепления ключично-клювовидной связки. Важно отметить, что выполнение отслаивания дельтовидной мышцы начинали у самого края ключицы вдоль волокон мышцы. Это позволяло в дальнейшем более щадящее выполнить остальные хирургические манипуляции. С латеральной стороны под клювовидный отросток вводили специальное направляющее устройство, необходи-

мое для последующего высверливания канала в клювовидном отростке лопатки. Конструкция данного направляющего устройства обеспечивала защиту нейроваскулярных структур при формировании канала.

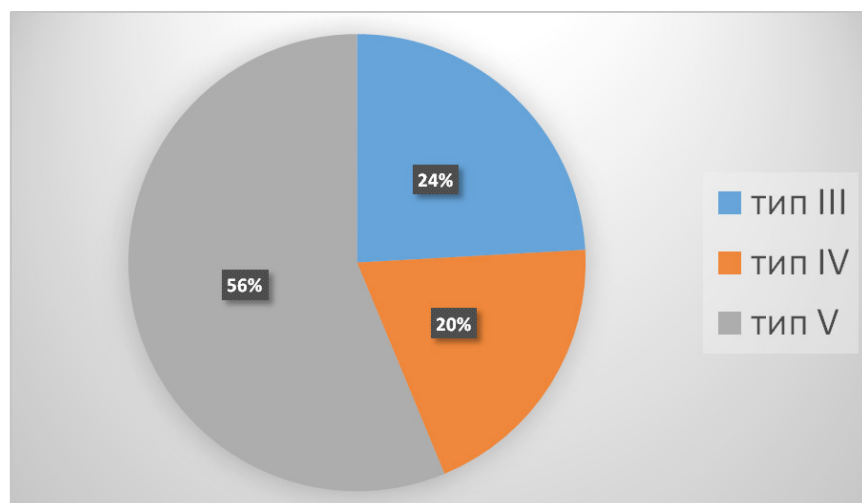
Канал должен быть сформирован в основании клювовидного отростка в проекции прикрепления клювовидно-ключичных связок. От топографии канала зависит наличие или отсутствие в дальнейшем подвывиха ключицы кпереди.

3. В направлятель вставляли специальную втулку, по которой проводили спицу диаметром 2,4 мм. Канюлированным сверлом диаметром 4,3 мм по спице формировали сквозной канал в клювовидном отростке.

4. Моделировали две динамические блок-системы «опорная площадка — нить». Для этого использовали титановые фиксаторы Flipptack (в дальнейшем мы будем их называть «опорные площадки») длиной 12 мм и шириной 4 мм, с четырьмя отверстиями. Титановый сплав (TiAl6V4) как инертный материал значительно уменьшает реакцию окружающих мягких тканей на инородное тело.

Через центральные отверстия обеих опорных площадок проводили полиэстеровую нерассасывающуюся плетеную нить диаметром 1 мм. Для моделирования блок-системы соединяли две опорные площадки и проводили через центральные отверстия один конец нити. Затем этот же конец нити проводили через рядом находящееся отверстие, далее — опять в те же самые отверстия. В результате оставались связанные между собой опорные площадки с проведенной между центральными отверстиями в два оборота нитью; концы нити оставляли с одной стороны. Раздвигали опорные площадки на расстояние 7–8 см, создавая две петли, одна из которых замкнута. Потягивание за концы нити позволяло свободно приближать друг к другу опорные площадки, а завязывание концов нити обеспечивало фиксирование между собой опорных площадок на необходимом расстоянии между ними.

5. На следующем этапе опорные площадки каждой блок-системы вводили в сформированный ранее в клювовидном отростке канал при помощи специального толкателя. Сверлом диаметром 4,3 мм формировали два сквозных туннеля в ключице, в проекциях прикреплений *lig. conoideum* и *lig. trapezoidum*. При помощи иглы Дешана проводили петлю через каналы в ключице и выводили при помощи зажима из раны. Через одно из наружных отверстий верхней опорной площадки проводили нить, концы которой продевали в ранее выведенную петлю. Затягиванием концов

**Рис 1.** Распределение больных по типам повреждения АКС

петли нить, заправленную в опорную площадку, выводили наружу (снизу вверх) через канал в ключице. Последующим потягиванием этой нити верхнюю опорную площадку проводили снизу вверх через канал в ключице. Такими манипуляциями проводили опорные площадки снизу вверх на ключицу. Попеременным натяжением концов нити обеих блок-систем опорные площадки стягивали между собой, осуществляя фиксацию вправленного АКК. Концы нити связывали между собой.

Клинический случай. Больной У. 35 лет получил травму в результате удара о борт хоккейной коробки во время игры. При поступлении обследован клинически и рентгенологически. Диагноз: вывих акромиального конца правой ключицы тип V по классификации Rockwood.

Предоперационная подготовка включала лабораторные и инструментальные исследования (рис. 3).

Послеоперационное течение гладкое, рана зажила первичным натяжением. Срок иммобилизации в косыночной повязке после операции составил 3 дня (до купирования болевого синдрома). Пациент строго соблюдал рекомендации по реабилитации, уже через день проводил постепенное восстановление объема движений. Снятие швов проведено в амбулаторных условиях. Через 3–5 недель были добавлены постепенные силовые нагрузки. Осмотр сделан через 6 недель и 6 месяцев после операции (рис. 5).

Результат расценен как хороший. Через 6 недель было разрешено полностью нагружать конечность. Через 2,5 месяца, после периода реабилитации, пациент вернулся в профессиональный спорт. Сделанная через 6 месяцев рентгенограмма показала отсутствие миграции фиксатора и подвывиха ключицы. Отмечено полное функциональное восстановление.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отдалённые результаты были изучены нами у всех 112 пациентов. Осмотр и опрос пациентов проводились 3–4 раза в год, с интервалом не менее 3 месяцев. Оценку исходов лечения проводили по данным последнего обследования.

Стабильность АКС оценивали по результатам проведения клинических тестов. Всем пациентам, явившимся в клинику на осмотр, производили рентгенографию АКС в стандартных проекциях с нагрузкой и в проекции Zanca. При необходимости обследование пациентов дополняли лучевой компьютерной диагностикой (МРТ, КТ). Субъективные ощущения пациентов, степень функционального восстановления плечевого сустава, ограничение жизнедеятельности за счет верхней конечности систематизировали и документировали в соответствии с положениями шкалы DASH (Disability of the Arm, Shoulder and Hand) [23]. Объективные результаты исследований также оценивали в соответствии с требованиями этой шкалы.

При анализе результатов лечения оценивали жалобы больных; наличие и характер болевого синдрома оценивали по шкале VAS (visual analog scale) — психологическому тесту, основанному на субъективной оценке пациентом своих ощущений [24]. Оценивали остаточную деформацию в проекции АКК; амплитуду движений в плечевом суставе; функциональную способность верхней конечности; результаты клинических тестов (симптом «клавиши») и рентгенологических (конгруэнтность сустава) методов исследования.

В 111 (99,1%) случаях получен хороший результат. У одного пациента выявлено осложнение в виде инфицирования операционной раны, которое развивалось в пределах кожных покровов и не потребовало ревизионного

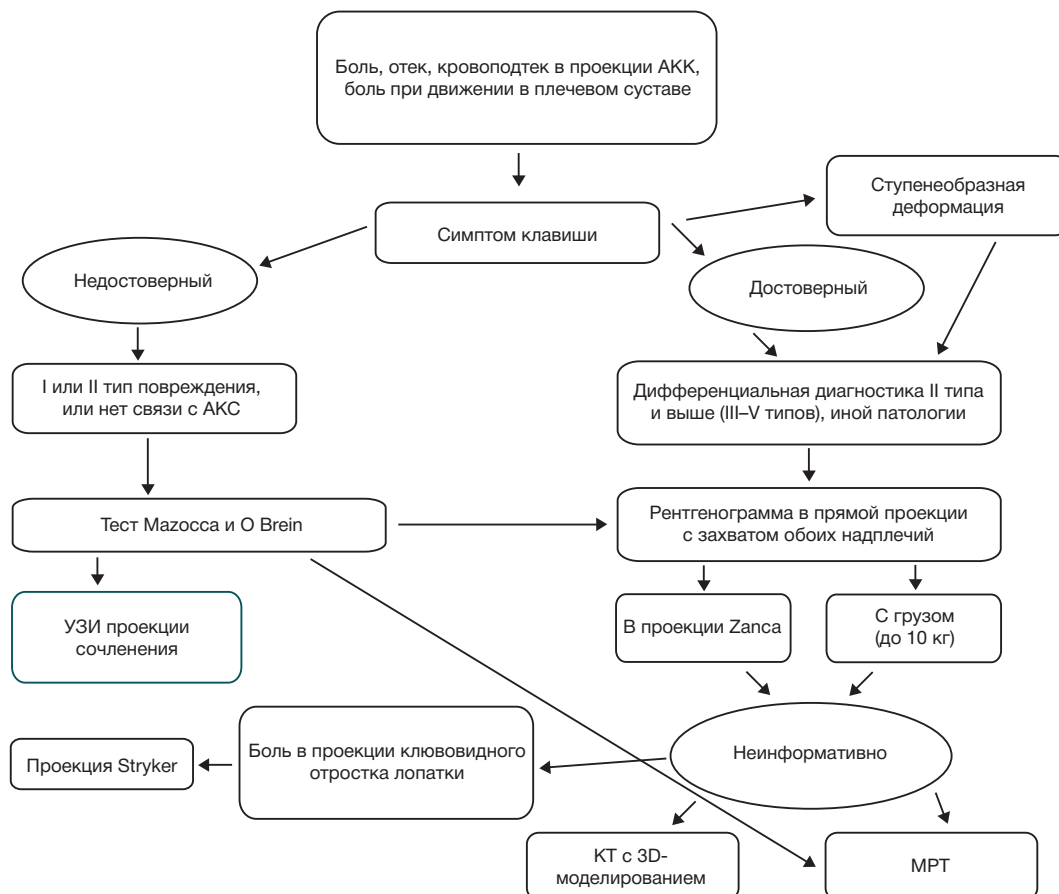


Рис 2. Схема диагностики пациентов с патологией АКК

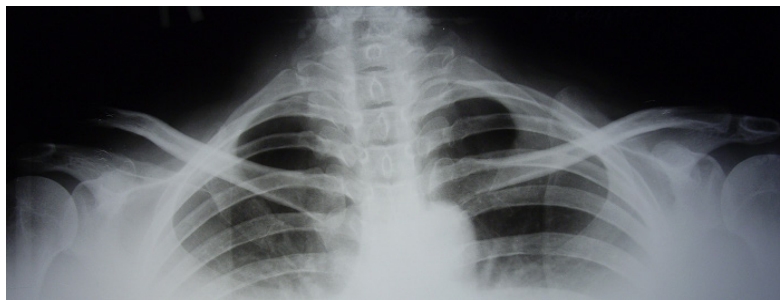


Рис 3. Результаты проведенного рентгенологического исследования. На рентгенограмме определяется вывих акромиального конца правой ключицы



Рис 4. Вывих устранен, проведено фиксирование. Состояние после двухпучковой реконструкции АКС

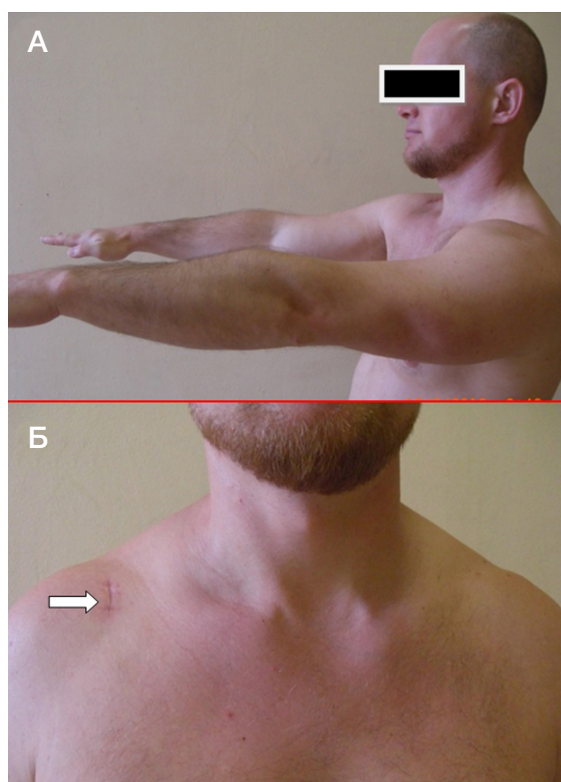


Рис 5. Результат оперативного лечения через 6 месяцев после операции. **А.** Объем движений расценен как полный. **Б.** Вид послеоперационного рубца (указан стрелкой)

оперативного лечения. Через 8 дней пациент был выписан из стационара.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Немаловажное значение в прогнозе исхода оперативных вмешательств имеют сроки обращения больных после получения травмы [25]. Преимущества метода восстановления недавно полученных повреждений АКС методом динамической двухпучковой реконструкции очевидны: он

малоинвазивен (разрез составляет не более 3 см); специальные направляющие позволяют снизить до минимума риск повреждения нейроваскулярных структур; в ходе оперативного вмешательства акромиально-ключичный сустав не обнажается и не подвергается травматизации мягкотканые образования акромиально-ключичного сустава; метод прост в выполнении, характеризуется короткой продолжительностью операции (в среднем от 20 до 40 мин); отсутствием необходимости удаления импланта. Особо хотелось бы отметить лучшие функциональные результаты

применения метода по сравнению с другими: анатомическое соединение и его динамичность не нарушают анатомию и биомеханику АКС, позволяя в кратчайшие сроки восстанавливать функцию конечности, что крайне важно для профессиональных спортсменов. Данная методика позволяет восстанавливать АКС, исключая появление в послеоперационном периоде как вертикальной, так и горизонтальной нестабильности.

ВЫВОДЫ

Нами разработана и внедрена в практику методика проведения малоинвазивной динамической двухпучковой ре-

конструкции ключично-акромиального сочленения (патент RU 2017112434 от 19.10.2017) на ранних стадиях повреждения. Принципиально важным является то, что реконструкция сочленения не нарушает биомеханику последнего, и позволяет полностью воссоздать анатомию клювовидно-ключичной связки за счет формирования двух нитевых серкляжей между клювовидным отростком и ключицей в области прохождения естественных связок. Методика обеспечивает профилактику рецидива, путем достижения одновременно вертикальной и горизонтальной стабильности при сохранении физиологической подвижности. Разработанный перспективный метод может быть рекомендовать в практику травматологических отделений.

Литература

1. Файтельсон А. В., Дубровин Г. М., Тихоненко С. Н. Раннее восстановление функции плечевого сустава при вывихах акромиального конца ключицы. В сборнике: Колленный и плечевой сустав XXI век: материалы всероссийского симпозиума. Ярославль, 2000: 294–5.
2. Pogorzelski J, Beitzel K, Ranuccio F, Wörtler K, Imhoff AB, Millett PJ et al. The acutely injured acromioclavicular joint - which imaging modalities should be used for accurate diagnosis? A systematic review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017 Dec 8; 18 (1): 515. doi: 10.1186/s12891-017-1864-y.
3. Chang N, Furey A, Kurdin A. Operative Versus Nonoperative Management of Acute High-Grade Acromioclavicular Dislocations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Orthop Trauma.* 2018 Jan; 32 (1): 1–9. doi: 10.1097/BOT.0000000000001004.
4. Брагин В. Б., Безгодков Ю. А. Сравнительная оценка способов лечения вывихов ключицы. *Вестник хирургии им. И. И. Грекова.* 2002; 161 (4): 33–6.
5. Cisneros LN, Reiriz JS. Management of chronic unstable acromioclavicular joint injuries. *J Orthop Traumatol.* 2017; 18 (4): 305–318. doi: 10.1007/s10195-017-0452-0.
6. Grutter PW, Petersen SA. Anatomical acromioclavicular ligament reconstruction: a biomechanical comparison of reconstructive techniques of the acromioclavicular joint. *Am J Sports Med.* 2005; 11: 1723–28.
7. Motamedi AR, Blevins FT, Willis MC. Biomechanics of the coracoclavicular ligament complex and augmentations used in its repair and reconstruction. *Am J Sports Med.* 2000; 28 (3): 380–4.
8. Poncelet E, Demondion X, Lapègue F, Drizenko A, Cotten A, Francke JP. Anatomic and biometric study of the acromioclavicular joint by ultrasound. *Surg Radiol Anat.* 2003; 25 (5–6): 439–45.
9. Сорокин А. А. Тактика хирургического лечения вывихов акромиального конца ключицы [диссертация]. М.: 2008.
10. Калинин Е. Б., Калинин Б. М., Якимов Л. А., Артемов А. Ю., Кашеев А. А., Кашеев Г. А. Хирургическое лечение пациентов с застарелыми вывихами акромиального конца ключицы. *Московский хирургический журнал.* 2014; 4 (38): 16–9.
11. Chen CH, Dong QR, Zhou RK et al. Effects of hook plate on shoulder function after treatment of acromioclavicular joint dislocation. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7 (9): 2564–70. PMID: 25356110.
12. Zhu YY, Cui HY, Jiang PQ, Wang JL. Complications of treatment of acromioclavicular joint dislocation and unstable distal clavicular fracture with clavicular hook plate. *Zhongguo Gu Shang.* 2013; 26 (11): 927–31. PMID: 24605745.
13. Nüchtern JV, Sellenschloh K, Bishop N et al. Biomechanical evaluation of 3 stabilization methods on acromioclavicular joint dislocations. *Am J Sports Med.* 2013; 41 (6): 1387–94. DOI: 10.1177/0363546513484892.
14. Старых В. С., Панахал А. Б. Способ пластики акромиально-ключичной связки. В сборнике: Современные медицинские технологии и перспективы развития военной травматологии и ортопедии: мат-лы Юбилейной научной конференции (г. Санкт-Петербург, 6–8 апреля 2000 г.). СПб. Морсар АВ, 2000: 139–140.
15. Стукалов В. С. Восстановительное лечение вывихов акромиального конца ключицы [диссертация]. Самара: 2009.
16. Harris RI, Wallace AL, Harper GD. Structural properties of the intact and the reconstructed coracoclavicular ligament complex. *Am J Sports Med.* 2000; 28 (1): 103–8.
17. Tienen TG, Oyen JF, Eggen PJ. A modified technique of reconstruction for complete acromioclavicular dislocation: a prospective study. *Am J Sports Med.* 2003; 5: 655–59.
18. Абдула Х. М. Оптимизация хирургического лечения повреждений акромиально-ключичного сустава [диссертация]. Уфа: 2003.
19. Файтельсон А. В. Совершенствование хирургического и аппаратного способов лечения вывихов акромиального конца ключицы [диссертация]. Курск: 2002.
20. Riand N, Sadowski C, Hoffmeyer P. Acute acromioclavicular dislocations. *Acta Orthop Belg.* 1999; 65 (4): 393–403.
21. Petersen W, Zantop T, Wellmann M, Rosslenbroich S. Minimally Invasive Acromioclavicular Joint Reconstruction (MINAR). *Oper Orthop Traumatol.* 2010; 22: 52–61.
22. Beitzel K, Mazzocca AD, Bak K, Itoi E, Kibler WB, Mirzayan R et al. ISAKOS upper extremity committee consensus statement on the need for diversification of the Rockwood classification for acromioclavicular joint injuries. *Arthroscopy.* 2014; 30 (2): 271–8. doi: 10.1016/j.arthro.2013.11.005.
23. Ягджян Г. В., Абраамян Д. О., Григорян Б. Э. Универсальный протокол исследования функционального исхода лечения полного перерыва срединного и локтевого нервов на предплечье. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* 2005; 4: 99.
24. Wewers ME, Lowe NK. A critical review of visual analogue scales in the measurement of clinical phenomena. *Res Nurs Health.* 1990; 13: 227–36.
25. Козлов А. В. Хирургическая коррекция трофических и функциональных нарушений при травме верхней конечности [диссертация]. Новосибирск: 2011.

References

1. Fajtel'son AB, Dubrovin GM., Tihvnenko SN. Rannee vosstanovlenie funktsii plechevogo sustava pri vyvihah akromial'nogo konca kljuchicy. V sbornike: Kolennyj i plechevoj sustav XXI vek: Matriali vserrssijskogo simpoziuma. Jaroslavl, 2000.

2. Pogorzelski J, Beitzel K, Ranuccio F, Wörtler K, Imhoff AB, Millett PJ et al. The acutely injured acromioclavicular joint - which imaging modalities should be used for accurate diagnosis? A systematic review. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2017 Dec 8; 18(1): 515. doi: 10.1186/s12891-017-1864-y.
3. Chang N, Furey A, Kurdin A. Operative Versus Nonoperative Management of Acute High-Grade Acromioclavicular Dislocations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Orthop Trauma.* 2018 Jan; 32 (1): 1–9. doi: 10.1097/BOT.0000000000001004.
4. Bragin VB, Bezgodkov UA. Sravnitel'naja ozenka sposobov lechenija vyvihov kluchizy. *Vestnik hirurgii imeni II Grekova.* 2002; 161 (4): 33–6.
5. Cisneros LN, Reiriz JS. Management of chronic unstable acromioclavicular joint injuries. *J Orthop Traumatol.* 2017; 18 (4): 305–318. doi: 10.1007/s10195-017-0452-0.
6. Grutter PW, Petersen SA. Anatomical acromioclavicular ligament reconstruction: a biomechanical comparison of reconstructive techniques of the acromioclavicular joint. *Am J Sports Med.* 2005; 11: 1723–28.
7. Motamedi AR, Blevins FT, Willis MC. Biomechanics of the coracoclavicular ligament complex and augmentations used in its repair and reconstruction. *Am J Sports Med.* 2000; 28 (3): 380–4.
8. Poncelet E, Demondion X, Lapègue F, Drizenko A, Cotten A, Francke JP. Anatomic and biometric study of the acromioclavicular joint by ultrasound. *Surg Radiol Anat.* 2003; 25 (5–6): 439–45.
9. Sorokin A. A. Taktika hirurgicheskogo lechenija vyvihov akromialnogo konca kluchicy [dissertacija]. M.: 2008.
10. Kalinskij EB, Kalinskij BM, Jakimov LA, Artemov AU, Kasheev AA, Kashe GA. Hirurgicheskoe lechenie pacientov s zastarelymi vyvhami akromialnogo konca kluchizy. *Moskovski hirurgicheskij zhurnal.* 2014; 4 (38): 16–9.
11. Chen CH, Dong QR., Zhou RK et al. Effects of hook plate on shoulder function after treatment of acromioclavicular joint dislocation. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7 (9): 2564–70. PMID: 25356110.
12. Zhu YY, Cui HY, Jiang PQ, Wang JL. Complications of treatment of acromioclavicular joint dislocation and unstable distal clavicular fracture with clavicular hook plate. *Zhongguo Gu Shang.* 2013; 26 (11): 927–31. PMID: 24605745.
13. Nüchtern JV, Sellenschloh K, Bishop N et al. Biomechanical evaluation of 3 stabilization methods on acromioclavicular joint dislocations. *Am J Sports Med.* 2013; 41 (6): 1387–94. DOI: 10.1177/0363546513484892.
14. Staryh VS, Panakhal AB. Sposob plastiki akromial'no-kluchichnoj svjazki. V sbornike: *Sovremennye medicinskie tehnologii i perspektivy razvitiya voennoj travmatologii i ortopedii: materialy Jubilejnoy nauchnoj konferencii (g. Sankt-Peterburg, 6–8 aprelya 2000 g.).* SPb. Morsar AV, 2000: 139–140.
15. Stukalov VS, Vosstanovitel'noe lechenie vyvihov akromial'nogo konca kluchicy [dissertacija]. Samara: 2009.
16. Harris RI, Wallace AL, Harper GD. Structural properties of the intact and the reconstructed coracoclavicular ligament complex. *Am J Sports Med.* 2000; 28 (1): 103–8.
17. Tienen TG, Oyen JF, Eggen PJ. A modified technique of reconstruction for complete acromioclavicular dislocation: a prospective study. *Am J Sports Med.* 2003; 5: 655–59.
18. Abdula HM. Optimizacija hirurgicheskogo lechenija povrezhdenij akromial'no-kluchichnogo sustava [dissertacija]. Ufa: 2003.
19. Fajtelson AV. Sovershenstvovanie hirurgicheskogo i apparatnogo sposobov lechenija vyvihov akromial'nogo konca kluchicy [dissertacija]. Kursk: 2002.
20. Riand N, Sadowski C, Hoffmeyer P. Acute acromioclavicular dislocations. *Acta Orthop Belg.* 1999; 65 (4): 393–403.
21. Petersen W, Zantop T, Wellmann M, Rosslenbroich S. Minimally Invasive Acromioclavicular Joint Reconstruction (MINAR). *Oper Orthop Traumatol.* 2010; 22: 52–61.
22. Beitzel K, Mazzocca AD, Bak K, Itoi E, Kibler WB, Mirzayan R et al. ISAKOS upper extremity committee consensus statement on the need for diversification of the Rockwood classification for acromioclavicular joint injuries. *Arthroscopy.* 2014; 30 (2): 271–8. doi: 10.1016/j.arthro.2013.11.005.
23. Jagdzhan GV, Abraamjan DO, Grigorjan BE. Universalnij protokol issledovaniya funkczionalnogo ishoda lechenija polnogo pereryva sredinnogo i loktevogo nervov na predplechje. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoj i esteticheskoy hirurgii.* 2005; 4: 99.
24. Wewers ME, Lowe NK. A critical review of visual analogue scales in the measurement of clinical phenomena. *Res Nurs Health.* 1990; 13: 227–36.
25. Kozlov AV. Hirurgicheskaja korekcija troficheskikh i funkczional'nyh narushenij pri travme verhnej konechnosti [dissertacija]. Novosibirsk: 2011.