

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 Гейдебрект, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)

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

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

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

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

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

Ю. Г. 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. Мунлит, 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)

А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)

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



Журнал включён в WoS с 2018 года



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



Журнал включён в РИНЦ, ИФ 2014: 0,139



Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Здесь находится открытый архив журнала



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

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

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



Подписано в печать 24.08.2018
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)

Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)

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 24.08.2018
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР

5

***Mycobacterium tuberculosis*: проблемы лекарственной устойчивости, вирулентности и подходы к их решению**

В. Н. Даниленко, М. В. Зайчикова, И. Н. Дьяков, К. В. Шур, Д. А. Маслов

***Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance, virulence and possible solutions**

Danilenko VN, Zaychikova MV, Dyakov IN, Shur KV, Maslov DA

МНЕНИЕ

13

Лимфоциты Th1: корреляты протекции или маркеры активности туберкулезной инфекции?

И. В. Лядова, А. В. Пантелеев, И. Ю. Никитина, Т. В. Радаева

Th1 lymphocytes: correlates of protection or markers of tuberculosis infection activity?

Lyadova IV, Panteleev AV, Nikitina IYu, Radaeva TV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

20

Полногеномное секвенирование и сравнительный геномный анализ мутантов *Mycobacterium smegmatis*, устойчивых к соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов — кандидатов в противотуберкулезные препараты

Д. А. Маслов, О. Б. Беккер, К. В. Шур, А. А. Ватлин, А. В. Коротина, В. Н. Даниленко

Whole-genome sequencing and comparative genomic analysis of *Mycobacterium smegmatis* mutants resistant to imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines, antituberculosis drug candidates

Maslov DA, Bekker OB, Shur KV, Vatlin AA, Korotina AV, Danilenko VN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

24

Создание выборки клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* линии Beijing-B0 и определение предикторов иммунной дисфункции пациентов-источников

К. В. Шур, Т. В. Умпелева, О. Б. Беккер, Д. А. Маслов, М. В. Зайчикова, Д. В. Вахрушева, В. Н. Даниленко

Compilation of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing-B0 lineage sample and identifying predictors of immune dysfunction in source patients

Shur KV, Umpeleva TV, Bekker OB, Maslov DA, Zaychikova MV, Vakhrusheva DV, Danilenko VN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

30

Определение доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины с помощью высокопроизводительного секвенирования набора частотных однонуклеотидных полиморфизмов

Е. Шубина, Т. Янкевич, А. Ю. Гольцов, И. С. Мукосей, Т. О. Кочеткова, А. А. Быстрицкий, И. Ю. Барков, Н. К. Тетруашвили, Л. В. Ким, Д. Ю. Трофимов

Quantification of fetal DNA in the plasma of pregnant women using next generation sequencing of frequent single nucleotide polymorphisms

Shubina J, Jankevic T, Goltsov AYu, Mukosey IS, Kochetkova TO, Bystritsky AA, Barkov IYu, Tetrushvili NK, Kim LV, Trofimov DYu

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

35

Определение мутаций гена *CFTR* у детей с муковисцидозом

А. И. Никифорова, Д. Д. Абрамов, Г. Ю. Зобкова, А. В. Горяинова, С. Ю. Семькин, Е. Шубина, А. Е. Донников, Д. Ю. Трофимов

Detection of *CFTR* mutations in children with cystic fibrosis

Nikiforova AI, Abramov DD, Zobkova GYu, Goriainova AV, Semykin SYu, Shubina J, Donnikov AE, Trofimov DYu

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

42

Персистенция онколитического энтеровируса Коксаки А7 в подкожных мышечных ксенотрансплантатах глиобластом человека при экспериментальной терапии

А. С. Сидоренко, А. О. Желтухин, Т. Х. Ле, А. В. Соболева, А. В. Липатова, Д. А. Гольбин, П. М. Чумаков

Persistence of oncolytic Coxsackie virus A7 in subcutaneous human glioblastoma xenografts in mice in the context of experimental therapy

Sidorenko AS, Zheltukhin AO, Le TH, Soboleva AV, Lipatova AV, Golbin DA, Chumakov PM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

49

Активация CD4⁺CD39⁺ Т-клеток при колоректальном раке

Г. А. Жулай, А. В. Чуров, Е. К. Олейник, А. А. Романов, П. Н. Семакова, В. М. Олейник

Activation of CD4⁺CD39⁺ T cells in colorectal cancer

Zhulai GA, Churov AV, Oleinik EK, Romanov AA, Semakova PN, Oleinik VM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

56

Влияние полиморфизма NOS3 786С/Т на уровень оксида азота у коморбидных больных бронхиальной астмой и гипертонической болезнью

А. В. Шаханов, О. М. Урясьев

Effect of the NOS3 786C/T polymorphism on the levels of nitric oxide in patients with asthma and comorbid hypertension

Shakhanov AV, Uryasev OM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

61

Электростимуляция как альтернатива физической тренировке у пациентов с ХОБЛ

Т. В. Кунафина, А. Г. Чучалин, А. С. Белевский, Н. Н. Мещерякова, Е. Н. Калманова, О. В. Кожевникова

Neuromuscular electrical stimulation as an alternative to physical exercise in patients with COPD

Kunafina TV, Chuchalin AG, Belevsky AS, Mescheryakova NN, Kalmanova EN, Kozhevnikova OV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

67

Изучение морфофункциональных изменений фолликулов щитовидной железы крыс в норме и при гипотиреозе после воздействия среднеинтенсивного лазерного излучения

И. В. Смелова, Е. С. Головнева

The study of morphological and functional changes in the thyroid follicles of healthy rats and rats with experimentally induced hypothyroidism following exposure to medium-power laser radiation

Smelova IV, Golovneva ES

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

75

Артериовенозная фистула после удаления вестибулярной шванномы

А. А. Реутов, М. С. Аронов, Ю. В. Кушель

Formation of arteriovenous fistula following surgical resection of vestibular schwannoma

Reutov AA, Aronov MS, Kushel YuV

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

80

Актуальность удаления невуса Ядассона у лиц молодого возраста

Т. А. Гайдина, А. С. Дворников, П. А. Скрипкина, Г. Б. Арутюнян

Rationale for removing nevus sebaceus of Jadassohn in young patients

Gaydina TA, Dvornikov AS, Skripkina PA, Arutyunyan GB

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

84

Множественная реплантация зубов

А. В. Иващенко, И. М. Федяев, А. Е. Яблоков, И. Н. Колганов, Е. И. Баландин, В. П. Тлустенко

Intentional replantation of multiple teeth

Ivashchenko AV, Fedyayev IM, Yablokov AE, Kolganov IN, Balandin EI, Tlustenko VP

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: ПРОБЛЕМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ, ВИРУЛЕНТНОСТИ И ПОДХОДЫ К ИХ РЕШЕНИЮ

В. Н. Даниленко^{1,2}✉, М. В. Зайчикова¹, И. Н. Дьяков³, К. В. Шур¹, Д. А. Маслов¹

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

² Научно-исследовательский центр биотехнологии антибиотиков «БИОАН», Москва

³ Лаборатория биосинтеза иммуноглобулинов, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва

Несмотря на достигнутые успехи мероприятий, направленных на снижение смертности от туберкулеза, данное заболевание по-прежнему крайне распространено, а в некоторых регионах России численность больных достигает показателей, характерных для уровня эпидемии. Многолетнее широкое применение антибиотиков, изменение состава микробиоты человека и ряд других факторов привели к появлению лекарственноустойчивых и высоковирулентных сублиний *Mycobacterium tuberculosis*. Недостаточность уровня и объема фундаментальных знаний о механизмах возникновения и формирования клонов *M. tuberculosis*, одновременно устойчивых ко многим антибиотикам и обладающих повышенной патогенностью, усложняет проблему и требует разработки новой концепции борьбы с туберкулезом. Ключевые понятия этой концепции — «суперорганизм», «микробиота» и «резистом». Возникновение форм с множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивостью следует рассматривать в контексте их формирования в составе некоторого суперорганизма, элементами которого являются собственно организм человека, его микробиота (в том числе влияющая на иммунный статус) и *M. tuberculosis*. Клинически тестируемые фенотипы и генотипы штаммов МЛУ/ШЛУ формируются на основе клональной изменчивости *M. tuberculosis* в «суперорганизме». Поэтому при разработке противотуберкулезных препаратов следует обращать особое внимание на создание вакцин, адъювантов и пробиотиков с селективными иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственная устойчивость, адъюванты, вакцины, перекрестная лекарственная устойчивость

Финансирование: работа была выполнена в рамках проекта Министерства образования и науки Российской Федерации №RFMEFI61317X0068 — «Роль регион-специфичных полиморфизмов генов вирулентности в формировании лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*».

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

Статья получена: 05.06.2018 **Статья принята к печати:** 10.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.038

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: DRUG RESISTANCE, VIRULENCE AND POSSIBLE SOLUTIONS

Danilenko VN^{1,2}✉, Zaychikova MV¹, Dyakov IN³, Shur KV¹, Maslov DA¹

¹ Laboratory of Bacterial Genetics, Department Genetics and Biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics, Moscow

² BIOAN Research Center for Biotechnology of Antibiotics, Moscow

³ Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow

In spite of successful measures taken to reduce mortality associated with tuberculosis, this disease is still widely spread. In some Russian regions the number of patients with tuberculosis is no short of the epidemic level. The long-term use of antibiotics, changes in the composition of the human microbiota and a few other factors have contributed to the emergence of drug-resistant and hypervirulent sublineages of *Mycobacterium tuberculosis*. Insufficient fundamental knowledge of mechanisms underlying the emergence and evolution of *M. tuberculosis* clones simultaneously resistant to a wide spectrum of antibiotics and exhibiting increased virulence complicates the situation and necessitates a new strategy to combat the disease. The key concepts of this strategy are «superorganism», «microbiota» and «resistome». The emergence of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) strains should be addressed in the context of the «superorganism»; among its components are the human body, its microbiota (specifically, the bacteria that affect the immune status), and *M. tuberculosis* itself. Clinically studied phenotypes and genotypes of MDR/XDR strains are a result of clonal variability that *M. tuberculosis* develops as part of this «superorganism». Therefore, it is important to focus on the development of vaccines, adjuvants and probiotics with selective immunomodulating and antioxidant properties.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, adjuvants, vaccines, cross-drug resistance

Funding: this work was supported by the Project of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation «The role of region-specific polymorphisms of virulence genes in the formation of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*» (Project ID RFMEFI61317X0068).

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

Received: 05.06.2018 **Accepted:** 10.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.038

В 2017 г. была принята Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 г, одной из задач которой является «Изучение механизмов возникновения антимикробной резистентности и разработка противомикробных препаратов и альтернативных методов, технологии и средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений».

В настоящее время по оценкам Всемирной организации здравоохранения за 2016 г. туберкулез, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis*, является основной причиной смертности от инфекционных заболеваний (1,8 млн человек) и инфицирования (10,4 млн человек) [1]. Основной проблемой, возникающей в борьбе с туберкулезом, является возникновение и распространение штаммов с множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивостью [2–4]. По статистике, МЛУ диагностируют в 4% новых случаев инфицирования и у 21% ранее прошедших лечение пациентов, а в России эти показатели составляют 22 и 53% соответственно. Разработка препаратов приводит к появлению новых механизмов резистентности. Помимо приобретенной, микобактерии обладают развитой системой природной лекарственной устойчивости, опосредованной наличием большого числа генов и генетических систем, объединенных в резистом. Концепция резистома была предложена в 2006 г. и подразумевает набор детерминант резистентности к антибиотикам, в том числе природную устойчивость, характерную для данного штамма бактерий, конкретного организма или экосистемы [5, 6]. Резистом *M. tuberculosis* включает гены, кодирующие белки различных классов: клеточные транспортеры, модификаторы мишеней и химической структуры лекарств, транскрипционные факторы ответа на стресс и ряд других.

Наряду с распространением лекарственноустойчивых форм большое значение имеет проблема возникновения сублиний бактерии *M. tuberculosis*, отличающихся повышенной вирулентностью [7–9]. Исследования с использованием лабораторных моделей *in vitro* (макрофаги) и *in vivo* (мыши) выявили наличие корреляции между вирулентностью и принадлежностью возбудителя к определенному генотипу [10]. В подавляющем большинстве случаев повышенную вирулентность демонстрируют бактерии линии (генотипа) Beijing, имеющей наиболее важное эпидемиологическое значение ввиду все большего распространения в мире и высокой частоты возникновения лекарственноустойчивых форм [11, 12]. Штаммы линии Beijing отличаются генетической неоднородностью, что привело к выделению ряда сублиний. Хотя в целом линии Beijing свойственна повышенная частота возникновения форм с повышенной вирулентностью и лекарственной устойчивостью, эти характеристики варьируют в зависимости от сублинии [13, 14]. Более того, различия в значимых с точки зрения клинической практики характеристиках могут наблюдаться даже у штаммов в составе одной сублинии.

Опыт последних десятилетий по изучению механизмов возникновения МЛУ/ШЛУ-фенотипа *M. tuberculosis*, создание активных в отношении таких штаммов антибиотиков, а также разработка профилактических и лечебных генно-инженерных вакцин и адьювантов к ним выявили ряд научных проблем [15]. Создание новых препаратов невозможно без понимания молекулярно-генетических механизмов возникновения и формирования лекарственной устойчивости и вирулентности.

Проблема лекарственной устойчивости и разработка новых противотуберкулезных антибиотиков

Помимо приобретенной лекарственной устойчивости существует природная лекарственная устойчивость, характеризующаяся низким (по сравнению с индуцированной) уровнем резистентности к антибиотикам. При воздействии антибактериального препарата на клетки *M. tuberculosis* у патогена активируются транскрипционные факторы, контролирующие экспрессию генов, чьи продукты способствуют модификации антибиотика или его мишени и обратному транспорту лекарственного вещества или его активных производных из бактериальной клетки. Гены, продукты экспрессии которых вовлечены в реализацию природной лекарственной устойчивости, служат мишенью для воздействия ряда факторов (включая сами антибиотики), что может приводить к изменению их экспрессии и, как следствие, к повышению уровня устойчивости бактерии.

Использование антибиотиков при лечении сопутствующих туберкулезу инфекционных заболеваний (или попадание антибиотиков в организм человека с продуктами питания) может способствовать повышению лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

В 2015 г. пациентов, страдающих МЛУ- и ШЛУ-туберкулезом, насчитывалось более 580 000 человек. Столь широкое распространение эти штаммы получили в том числе из-за длительного применения одного и того же набора препаратов. Лишь недавно бедаквилин стал первым за последние 40 лет новым противотуберкулезным препаратом, применяемым в клинической практике [16].

В этой связи важной задачей становится разработка новых противотуберкулезных препаратов, к которым предъявляются следующие требования: высокая антимикробная активность как в отношении лекарственно чувствительных штаммов *M. tuberculosis*, так и в отношении штаммов с МЛУ, а также специфичность к новой биомишени. На сегодняшний день разработкой новых противотуберкулезных препаратов, способных преодолеть феномен МЛУ/ШЛУ и/или сократить время противотуберкулезной химиотерапии, занимаются ведущие фармацевтические компании и исследовательские группы по всему миру, среди которых Lilly TB Drug Discovery Initiative, GSK, Roche, Sanofi, TB Alliance, Colorado State University и целый ряд других (<http://www.newtbdrugs.org>).

В России работы по созданию противотуберкулезных препаратов активно велись в рамках программы «Фарма-2020». Так, в Институте общей генетики имени Н. И. Вавилова (Москва) совместно со специалистами по медицинской химии из ряда научных и коммерческих организаций (ИОС УрО РАН, ФГБНУ «НИИНА», ФГБУН НИОХ СО РАН, ИОХ РАН, АНО «НИЦ «БИОАН», ООО «Новые научные технологии») были проведены и проводятся доклинические исследования противотуберкулезных препаратов новых химических классов: производных усниновой кислоты [17], замещенных азоло (1,2,4,5) тетразинов [18], аминопиридинов и аминопиримидинов [19], производных аминопуринов [20].

С наступлением постгеномной эры поиск противотуберкулезных средств проводится по двум векторам: от мишени к препарату и от препарата к мишени [21–23].

На первый подход возлагались большие надежды, однако они не оправдались в полной мере. Многие препараты, показавшие высокие ингибирующие свойства *in vitro* в отношении фермента-мишени, не проявляли активности *in vitro* на *M. tuberculosis* из-за неспособности

проникнуть сквозь микобактериальную клеточную стенку, либо не были активными на моделях *in vivo* вследствие того, что выбранная мишень уже не была жизненно важной в этих условиях [22, 24].

Из успешных опытов такого рода стоит отметить эксперимент по отбору соединения BDM31343, ингибитора EthR, супрессора EthA, который, в свою очередь, активирует этионамид [25]. Препарат повышал чувствительность микобактерий к этионамиду и усиливал в три раза его действие в мышинных моделях [26].

В связи с низкой эффективностью такого подхода наметилась тенденция к возврату к более традиционному пути поиска: от препарата к мишени, основанному на клеточном отборе [24]. Этим путем были обнаружены все ныне используемые противотуберкулезные препараты, включая бедаквилин, претоманид, деламанид, Q203, SQ-109 и BTZ043 [27].

При таком подходе, зачастую, прибегают к высокопроизводительному отбору на бактериальных культурах штамма *M. tuberculosis* H37Rv, а также родственных ему модельных штаммах *M. bovis* BCG и *M. smegmatis* [24, 28]. Поиск ведут на гигантских библиотеках химических соединений. Так, сотрудники компании GSK последовательным отбором на штаммах *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv смогли отобрать из 2 млн соединений семь кандидатов в лекарства с высокой активностью, способностью проникать через клеточную стенку и низкой цитотоксичностью [29].

Подход «от препарата к мишени» сопряжен с необходимостью полногеномного секвенирования устойчивых к антибиотикам мутантов для обнаружения потенциальных биомишеней и проведения дальнейшей исследований, направленных на подтверждение действия отобранных кандидатов в лекарственные препараты на эти потенциальные биомишени [24].

Глобальной задачей остается необходимость разработки препаратов, способных воздействовать на персистирующие формы *M. tuberculosis*. На сегодняшний день наиболее эффективным антибиотиком, способным поражать персистирующие клетки *M. tuberculosis*, является пипразинамид [30]. Устойчивость к пипразинамиду может сильно влиять на клинический прогноз, особенно в случае туберкулеза, вызванного МЛУ-формами бактерий [31, 32].

Разработка противотуберкулезных вакцин

Несмотря на то что вакцинация против возбудителя туберкулеза проводится повсеместно, заболеваемость остается аномально высокой. Это можно объяснить низкой эффективностью применяемой для глобальной иммунизации вакцины BCG (0–80% в зависимости от возраста, иммунного статуса, региона проживания вакцинируемых и т. д.) [33]. На эффективность вакцины влияет и генетическое разнообразие патогена. Существует предположение, что снижение эффективности вакцинации в отношении повсеместно распространенных штаммов линии Beijing может являться одним из объяснений успешности данной группы [11]. На этом фоне создание новой противотуберкулезной вакцины относится к числу наиболее приоритетных исследований.

В настоящее время разработка противотуберкулезных вакцин ведется по двум направлениям. Первым из них является создание вакцин на основе непосредственно микроорганизма (аттенуированного), являющегося возбудителем этого заболевания. В качестве одного из подходов

используется создание нокаутных по различным генам мутантов *M. tuberculosis*. В их число входят гены, кодирующие различные факторы вирулентности: белки Mce (*mammalian cell entry*), способствующие инвазии патогена; белки PPE; белки, участвующие в биосинтезе липидов; сигма-факторы; двухкомпонентные системы и ряд других.

Второе направление, по которому ведется разработка противотуберкулезных препаратов, основано на использовании субъединичных вакцин, содержащих антигены возбудителей, полученные с использованием методов генной инженерии [34, 35]. К преимуществам таких вакцин относятся их высокая специфичность, меньшая аллергенность, простота производства и низкая себестоимость, удобство хранения и транспортировки [36].

В число белков — кандидатов для разработки вакцин нового поколения входят: секретируемые белки Ag85-комплекса, участвующие во взаимодействии с Т-лимфоцитами, TB10.4 (*rv0288*), Hsp65, белки PE и PPE. Наиболее перспективными кандидатами считают белки систем секреции ESAT6 и CFP [36].

Однако, несмотря на значительный интерес к данной проблематике, разработка генно-инженерных вакцин не оправдала надежд. Главным недостатком таких вакцин стала их низкая иммуногенность.

При разработке генно-инженерных вакцин ключевой задачей является поиск оптимальных антигенов [36]. Высокую антигенность демонстрируют структурные элементы патогенности, которых у *M. tuberculosis* насчитывается более 300, и часть из них выбрана в качестве основы для разработки субъединичных вакцин [37]. Для многих из этих генов характерно наличие однонуклеотидного полиморфизма, приводящего к замене аминокислоты; такая замена может оказывать влияние на структуру белка-продукта, изменяя антигенную активность. В настоящее время при производстве генно-инженерных вакцин внутривидовое разнообразие *M. tuberculosis* не учитывается. Как правило используют последовательность генов стандартного лабораторного штамма H37Rv. При этом в отношении используемого для изготовления вакцин штамма *M. bovis* BCG установлено, что возникновение мутаций (вследствие микроэволюции при длительном культивировании) влияет на эффективность вакцины [38]. Не исключено, что антигенная активность белков у разных штаммов *M. tuberculosis* также различна.

Еще одним перспективным направлением представляется разработка кандидатной мукозальной вакцины против туберкулеза, индуцирующей формирование в первую очередь местного мукозального иммунитета. Важность индукции местного противотуберкулезного иммунитета показана в ряде работ, в которых интраназальное введение защитных IgA, предварительная обработка вирулентных *M. tuberculosis* защитными IgA или же интраназальное введение *M. bovis* BCG приводило к формированию эффективного ответа на инфицирование *M. tuberculosis* [39–42]. Применение мукозальной вакцины (отдельно или вместе с подкожной формой), могло бы решить проблемы, возникающие при BCG-вакцинации.

Стоит отметить, что к настоящему моменту ни одна из упомянутых выше новых противотуберкулезных вакцин не применяется в клинической практике. Как уже было сказано, недостатком таких вакцин является низкая иммуногенность, что обуславливает необходимость использования в составе вакцинных препаратов иммуоадьювантов.

Перспективы разработки адъювантов противотуберкулезных вакцин на основе штаммов пробиотиков

Под адъювантами подразумевают любые соединения, действующие неспецифично и повышающие иммунный ответ на вводимые вместе с ними антигены [43]. Из наиболее распространенных адъювантов можно выделить гидроксид алюминия и фосфат алюминия [44]. Однако для ряда антигенов адъювантный эффект этих соединений оказался недостаточным. К другим веществам, используемым в настоящее время в качестве адъювантов, можно отнести синтезируемый искусственно полиоксидоний и природный полисахарид хитозан. Кроме того, в качестве адъювантов испытывают различные компоненты клеток бактерий, которые содержат патогенассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), запускающие иммунный ответ. В частности, описано адъювантное действие молочнокислых бактерий [45], компонентов бактериальной стенки [46, 47], фибронектинсвязывающего белка 1 *Streptococcus pyogenes* [48], поверхностных флагеллинов [49] и других.

Отдельные штаммы пробиотиков, в частности бифидобактерий, способны запускать продукцию Th17- и Th1-цитокинов [50], играющих важную роль в мукозальном иммунном ответе при туберкулезной инфекции [39]. Таким образом, интраназальное введение пробиотиков может оказать адъювантный эффект в отношении мукозальной противотуберкулезной вакцины с формированием протективного иммунитета к вирулентным штаммам *M. tuberculosis*. Как представители комменсальной микрофлоры бифидобактерии и лактобациллы способны стимулировать механизмы иммунной защиты, влияя на секрецию и провоспалительных, и противовоспалительных цитокинов. При исследовании иммуномодулирующей

активности штаммов бактерий *in vitro*, как правило, используют культуры клеток кишечника (Caco-2, HT-29) или иммуноцитов (EC-6, THP-1). *In vivo* подобные эксперименты проводят на лабораторных животных (здоровых, с дефектами иммунной системы, гнотобионтах, а также имеющих экспериментальную инфекционную и неинфекционную патологию) [51, 52].

Следует отметить, что разные штаммы бифидо- и лактобацилл, а также их компоненты оказывают различный по степени выраженности иммуномодулирующий эффект [53–55]. Показано адъювантное действие лакто- и бифидобактерий при противовирусной вакцинации [56, 57], противострептококковой [58] и противоаллергической вакцинации [48, 59]. Введенные интраназально лактобациллы повышали местный мукозальный иммунитет, а также влияли на системные механизмы иммунной защиты, повышая устойчивость к заражению респираторно-синцитиальным вирусом [56, 57, 60] или вирусом гриппа. Представленные данные позволяют предположить, что применение интраназального введения пробиотиков в качестве адъювантов при вакцинации повысит эффективность формирования протективного мукозального иммунитета против *M. tuberculosis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента появления человека *M. tuberculosis* присутствует в популяции как в активной, так и в латентной форме [61]. На примере штаммов линии Beijing, зародившейся на территории Китая около 7 тыс. лет назад и в настоящее время распространившейся по всему миру, можно наблюдать продолжающуюся эволюцию возбудителя туберкулеза через формирование новых молодых линий, таких как B0/W-148 (рис. 1) [62, 63].

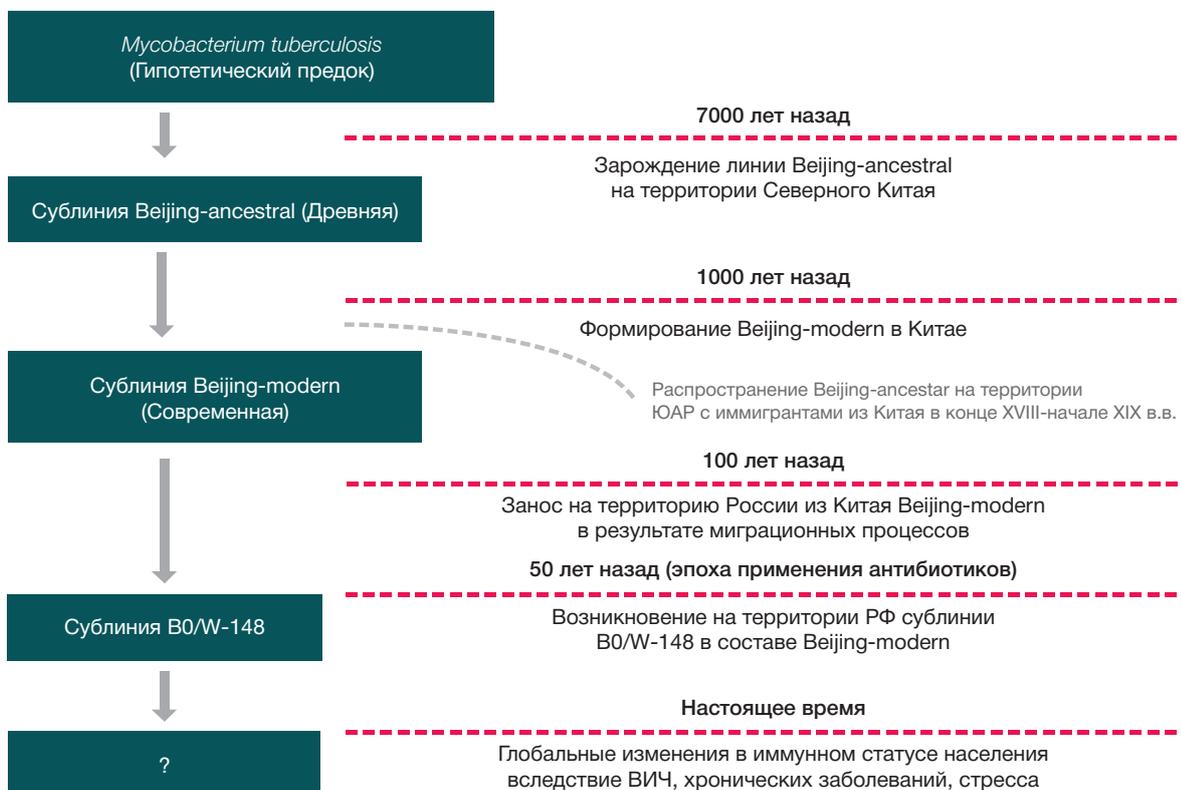


Рис. 1. Эволюция штаммов линии Beijing. Широкое применение антибиотиков в последние десятилетия обеспечило селективное преимущество клону B0/W-148, отличающемуся высоким уровнем лекарственной устойчивости

Показано, что на восприимчивость к возбудителю туберкулеза влияет уровень экспрессии различных генов в Т-лимфоцитах [64].

В связи с этим проблему формирования лекарственной устойчивости, увеличения вирулентности и разработки нового поколения противотуберкулезных препаратов следует рассматривать в контексте понятия «суперорганизм». Применение антибиотиков при противотуберкулезной терапии оказывает воздействие не только на патоген, но и на организм хозяина, что приводит, в числе прочего, к изменению состава кишечной микробиоты, и, как следствие, иммунитета, на который микробиота имеет непосредственное влияние. Прием антибиотиков влияет и на функционирование центральной и периферической нервных систем организма-хозяина, других систем и органов. Широкое применение антибиотиков в сельском хозяйстве ведет к их поступлению в продукты питания, что может приводить к формированию перекрестной лекарственной устойчивости. Кроме того, антибиотикотерапия при лечении микобактериозов может приводить к индукции латентного туберкулеза.

В целом можно констатировать, что основным фактором отбора при формировании лекарственноустойчивых

вирулентноадаптированных форм *M. tuberculosis* в течение последних 60 лет является неконтролируемое применение антибиотиков. К числу других факторов можно отнести широкое распространение заболеваний, оказывающих влияние на иммунитет: ВИЧ, сахарный диабет 2-го типа, гепатит В и др. Определенное влияние оказывает изменение кишечной микробиоты, в связи со сменой диеты, усилением вследствие глобализации миграционных потоков и т. д. Генетическое разнообразие *M. tuberculosis*, обусловленное единичными нуклеотидными заменами (в первую очередь, в генах, определяющих вирулентность, природную лекарственную устойчивость, переход в персистирующее состояние), IS-элементами и, возможно, CRISPR-cas системами, тоже оказывает влияние на адаптацию патогена к организму хозяина [65, 66].

Успехи в области эпидемиологии, молекулярной генетики, сравнительной геномики, протеомики и системной биологии, достигнутые за последние годы при изучении *M. tuberculosis*, приводят к пониманию многофакторности вызываемого им заболевания, и, как результат, к необходимости применения персонализированного подхода при лечении туберкулеза.

Литература

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Доступно по ссылке: <http://www.searo.who.int/tb/documents/global-tuberculosis-report-2016/en/>
- Прозоров А. А., Зайчикова М. В., Даниленко В. Н. Мутанты *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью: история появления, генетические и молекулярные механизмы устойчивости, возникающие проблемы. *Генетика*. 2012; 48 (1): 1–14.
- Dean AS, Cox H, Zignol M. Epidemiology of Drug-Resistant Tuberculosis. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1019: 209–20.
- Lange C, Chesov D, Heyckendorf J, Leung CC, Udwarda Z, Dheda K. Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment. *Respirology*. 2018. DOI: 10.1111/resp.13304. [Epub ahead of print].
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science*. 2006; 311 (5759): 374–7.
- Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5 (3): 175–86.
- Mikhecheva NE, Zaychikova MV, Melerzanov AV, Danilenko VN. A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages. *Genome Biol Evol*. 2017; 9 (4): 887–99.
- Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One*. 2015; 10: e0143682.
- Reiling N, Homolka S, Kohl TA, Steinhäuser C, Kolbe K, Schütze S, et al. Shaping the niche in macrophages: Genetic diversity of the *M. tuberculosis* complex and its consequences for the infected host. *Int J Med Microbiol*. 2017; pii: S1438–4221 (17) 30294–1.
- Reiling N, Homolka S, Walter K, Brandenburg J, Niwinski L, Ernst M, et al. Clade specific virulence patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. *MBio*. 2013; e00250–13.
- Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden ND, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011; 91 (6): 510–23.
- Zaychikova MV, Mikhecheva NE, Belay YO, Alekseeva MG, Melerzanov AV, Danilenko VN. Single nucleotide polymorphisms of Beijing lineage *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin system genes: their role in the changes of protein activity and evolution. *Tuberculosis (Edinb)*. 2018; 112: 11–19.
- Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9 (7): 838–45.
- Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, Almeida FM, Rezende AL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (7): 2615–24.
- Kaufmann SH, Evans TG, Hanekom WA. Tuberculosis vaccines: time for a global strategy. *Sci Transl Med*. 2015; 7 (276): 276fs8.
- Chahine EB, Karaoui LR, Mansour H. Bedaquiline: a novel diarylquinoline for multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Pharmacother*. 2014; 48 (1): 107–15.
- Bekker OB, Sokolov DN, Luzina OA, Komarova NI, Gatilov YV, Andreevskaya SN, et al. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Chem Res*. 2015; 24 (7): 2926–38.
- Маслов Д. А., Беккер О. Б., Даниленко В. Н. Тест-система *Mycobacterium smegmatis* aphVIII+ для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа. Патент РФ № 2566998, от 27.10.2015.
- Маслов Д. А., Беккер О. Б., Алексеева М. Г., Князева Л. М., Мавлетова Д. А., Афанасьев И. И., и др. Ингибиторы серин-треониновых протеинкиназ классов аминопиридинов и аминопиримидинов — кандидаты в препараты для лечения лекарственноустойчивых форм туберкулеза. *Вестник РГМУ*. 2017; 1: 42–7.
- Krasnov VP, Vigorov AY, Musiyak VV, Nizova IA, Gruzdev DA, Matveeva TV, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of N-(2-aminopurin-6-yl) and N-(purin-6-yl) amino acids and dipeptides *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26 (11): 2645–8.
- Sala C, Hartkoorn RC. Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more. *Future Microbiol*. 2011; 6 (6): 617–33.
- Lechartier B, Rybniker J, Zumla A, Cole ST. Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO Mol Med*. 2014; 6 (2): 158–68.
- Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatos SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein

- kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Curr Top Med Chem*. 2011; 11 (11): 1352–69.
24. Cooper CB. Development of Mycobacterium tuberculosis whole cell screening hits as potential antituberculosis agents. *J Med Chem*. 2013; 56 (20): 7755–60.
 25. Baulard AR, Betts JC, Engohang-Ndong J, Quan S, McAdam RA, Brennan PJ, et al. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem*. 2000; 275 (36): 28326–31.
 26. Willand N, Dirié B, Carette X, Bifani P, Singhal A, Desroses M, et al. Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. *Nat Med*. 2009; 15 (5): 537–44.
 27. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HW, Neefs JM, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 2005; 307 (5707): 223–7.
 28. Ananthan S, Faaleolea ER, Goldman RC, Hobrath JV, Kwong CD, Laughon BE, et al. High-throughput screening for inhibitors of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009; 89 (5): 334–53.
 29. Ballell L, Bates RH, Young RJ, Alvarez-Gomez D, Alvarez-Ruiz E, Barroso V, et al. Fueling open-source drug discovery: 177 small-molecule leads against tuberculosis. *Chem Med Chem*. 2013; 8 (2): 313–21.
 30. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003; 7 (1): 6–21.
 31. Zhang Y, Chiu Chang K, Leung C-C, Wai Yew W, Gicquel B, Fallows D, et al. 'ZS-MDR-TB' versus 'ZR-MDR-TB': improving treatment of MDR-TB by identifying pyrazinamide susceptibility. *Emerg Microbes Infect*. 2012; 1 (7): e5.
 32. Maslov DA, Zaïchikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, et al. Resistance to pyrazinamide in Russian Mycobacterium tuberculosis isolates: pncA sequencing versus Bactec MGIT 960. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015; 95 (5): 608–12.
 33. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. 2014; 58 (4): 470–80.
 34. Kaufmann SH, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis*. 2017; 56: 263–7.
 35. Méndez-Samperio P. Global Efforts in the Development of Vaccines for Tuberculosis: Requirements for Improved Vaccines Against Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2016; 84 (4): 204–10.
 36. Andersen P, Kaufmann SH. Novel vaccination strategies against tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4 (6). pii: a018523.
 37. Forrellad MA, Klepp L, Gioffré A, Sabioy García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*. 2013; 4 (1): 3–66.
 38. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (13): 5596–601.
 39. Uranga S, Marinova D, Martin C, Aguilo N. Protective Efficacy and Pulmonary Immune Response Following Subcutaneous and Intranasal BCG Administration in Mice. *J Vis Exp*. 2016; 115. DOI: 10.3791/54440.
 40. Zimmermann N, Thormann V, Hu B, Köhler AB, Imai-Matsushima A, Loch C, et al. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against Mycobacterium tuberculosis. *EMBO Mol Med*. 2016; 8 (11): 1325–39.
 41. Alvarez N, Infante JF, Borrero R, Mata D, Payan JB, Hossain MM, et al. Histopathological Study of the Lungs of Mice Receiving Human Secretory IgA and Challenged with Mycobacterium tuberculosis. *Malays J Med Sci*. 2014; 21 (3): 31–7.
 42. Alvarez N, Otero O, Camacho F, Borrero R, Tirado Y, Puig A, et al. Passive administration of purified secretory IgA from human colostrum induces protection against Mycobacterium tuberculosis in a murine model of progressive pulmonary infection. *BMC Immunol*. 2013; 14 (Suppl 1): S3.
 43. Savelkoul HFJ, Ferro VA, Strioga MM, Schijns VEJ.C. Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2015; 3 (1): 148–71.
 44. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis*. 1980; 2 (3): 370–83.
 45. Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FD, Smit E, et al. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol*. 1998; 41 (2): 155–67.
 46. Bessler WG, Huber M, Baier W. Bacterial cell wall components as immunomodulators-II. The bacterial cell wall extract OM-85 BV as unspecific activator, immunogen and adjuvant in mice *Int J Immunopharmacol*. 1997; 19 (9–10): 551–8.
 47. López P, González-Rodríguez I, Sánchez B, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Treg-inducing membrane vesicles from Bifidobacterium bifidum LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine*. 2012; 30 (5): 825–9.
 48. Medina E, Talay SR, Chhatwal GS, Guzmán CA. Fibronectin-binding protein I of Streptococcus pyogenes is a promising adjuvant for antigens delivered by mucosal route. *Eur J Immunol*. 1998; 28 (3): 1069–77.
 49. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol*. 2010; 185 (10): 5677–82.
 50. López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol*. 2010; 138 (1–2): 157–65.
 51. Caselli M, Vaira D, Cassol F, Calò G. Recombinant probiotics and their potential in human health. *Int J Probiotics & Prebiotics*. 2012; 7 (2): 53–8.
 52. Федорова И. А., Даниленко В. Н. Иммуногенные свойства пробиотического компонента микробиоты желудочно-кишечного тракта. *Успехи современной биологии*. 2014; 134 (2): 99–110.
 53. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of Bifidobacterium logum strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol*. 2007 Dec; 150 (3): 531–8.
 54. Khokhlova EV, Smeianov VV, Efimov BA, Kafarskaia LI, Pavlova SI, Shkoporov AN. Anti-inflammatory properties of intestinal Bifidobacterium strains isolated from healthy infants. *Microbiol Immunol*. 2012 Jan; 56 (1): 27–39.
 55. Аверина О. В., Ермоленко Е. И., Ратушный А. Ю., Тарасова Е. А., Борщев Ю. Ю., Леонтьева Г. Ф., и др. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах in vitro и in vivo. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (5): 443–54.
 56. Barbieri N, Villena J, Herrera M, Salva S, Alvarez S. Nasally administered Lactobacillus rhamnosus accelerate the recovery of humoral immunity in B lymphocyte-deficient malnourished mice. *J Nutr*. 2013; Feb; 143 (2): 227–35.
 57. Tomosada Y, Chiba E, Zelaya H, Takahashi T, Tsukida K, Kitazawa H, et al. Nasally administered Lactobacillus rhamnosus strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection. *BMC Immunol*. 2013 Aug; 15 (14): 40.
 58. Леонтьева Г. Ф., Крамская Т. А., Грабовская К. Б., Филимонова В. Ю., Лайно Д., Виллена Д., и др. Использование лактобацилл в качестве адъювантов при интраназальной иммунизации химерной пневмококковой вакциной. *Медицинская иммунология*. 2016; 18 (6): 545–54.
 59. Van Overtvelt L, Moussu H, Horiot S, Samson S, Lombardi V, Mascarell L, et al. Lactic acid bacteria as adjuvants for sublingual allergy vaccines. *Vaccine*. 2010 Apr 9; 28 (17): 2986–92.
 60. Harata G, He F, Hiruta N, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, et al. Intranasally administered Lactobacillusgasseri TMC0356 protects mice from H1N1 influenza virus infection by stimulating respiratory immune responses. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011; 27 (2): 411–16.
 61. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Apr; 16 (4): 202–13.
 62. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat Genet*. 2015; 47 (3): 242–9.
 63. Mokrousov I. Insights into the Origin, Emergence, and Current Spread of a Successful Russian Clone of Mycobacterium

- tuberculosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26 (2): 342–60.
64. Lyadova IV, Eruslanov EB, Khaidukov SV, Yeremeev VV, Majorov KB, et al. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to *Mycobacterium tuberculosis*-triggered disease. *J Immunol.* 2000 Nov 15; 165 (10): 5921–31.
65. Зайчикова М. В., Захаревич Н. В., Чекалина М. С., Даниленко В. Н. CRISPR-Cas системы *Mycobacterium tuberculosis*: структура модуля, изменение в процессе эволюции у различных линий, возможная роль в формировании вирулентности и лекарственной устойчивости. *Вестник РГМУ.* 2018; 2: 5–14. DOI: 10.24075/vrgmu.2018.015.
66. Shitikov E, Bespyatykh J, Ischenko D, Alexeev D, Karpova I, Kostryukova E, et al. Unusual Large-Scale Chromosomal Rearrangements in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 Cluster Isolates. *PLoS One.* 2014; 9 (1): e84971.

References

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Available from: <http://www.searo.who.int/tb/documents/global-tuberculosis-report-2016/en/>
- Prozorov AA, Zaichikova MV, Danilenko VN. *Mycobacterium tuberculosis* mutants with multidrug resistance: History of origin, genetic and molecular mechanisms of resistance, and emerging challenges. *Russian Journal of Genetics.* 2012; 48 (1): 1–14.
- Dean AS, Cox H, Zignol M. Epidemiology of Drug-Resistant Tuberculosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1019: 209–20.
- Lange C, Chesov D, Heyckendorf J, Leung CC, Udawadia Z, Dheda K. Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment. *Respirology.* 2018. DOI: 10.1111/resp.13304. [Epub ahead of print].
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science.* 2006; 311 (5759): 374–7.
- Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5 (3): 175–86.
- Mikhecheva NE, Zaychikova MV, Melerzanov AV, Danilenko VN. A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages. *Genome Biol Evol.* 2017; 9 (4): 887–99.
- Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One.* 2015; 10: e0143682.
- Reiling N, Homolka S, Kohl TA, Steinhäuser C, Kolbe K, Schütze S, et al. Shaping the niche in macrophages: Genetic diversity of the *M. tuberculosis* complex and its consequences for the infected host. *Int J Med Microbiol.* 2017; pii: S1438–4221 (17) 30294–1.
- Reiling N, Homolka S, Walter K, Brandenburg J, Niwinski L, Ernst M, et al. Clade specific virulence patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. *MBio.* 2013; e00250–13.
- Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb).* 2011; 91 (6): 510–23.
- Zaychikova MV, Mikhecheva NE, Belay YO, Alekseeva MG, Melerzanov AV, Danilenko VN. Single nucleotide polymorphisms of Beijing lineage *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin system genes: their role in the changes of protein activity and evolution. *Tuberculosis (Edinb).* 2018; 112: 11–19.
- Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (7): 838–45.
- Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, Almeida FM, Rezende AL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol.* 2014; 52 (7): 2615–24.
- Kaufmann SH, Evans TG, Hanekom WA. Tuberculosis vaccines: time for a global strategy. *Sci Transl Med.* 2015; 7 (276): 276fs8.
- Chahine EB, Karaoui LR, Mansour H. Bedaquiline: a novel diarylquinoline for multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Pharmacother.* 2014; 48 (1): 107–15.
- Bekker OB, Sokolov DN, Luzina OA, Komarova NI, Gatilov YV, Andreevskaya SN, et al. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Chem Res.* 2015; 24 (7): 2926–38.
- Maslov DA, Bekker OB, Danilenko VN. New Test System for Serine/Threonine Protein Kinase Inhibitors Screening. Patent RF № 2566998, 27.10.2015.
- Maslov DA, Bekker OB, Alekseeva MG, Kniazeva LM, Mavletova DA, Afanasyev II, et al. Aminopyridine- and aminopyrimidine-based serine/threonine protein kinase inhibitors are drug candidates for treating drug-resistant tuberculosis. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2017; 1: 38–43.
- Krasnov VP, Vigorov AY, Musiyak VV, Nizova IA, Gruzdev DA, Matveeva TV, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of N-(2-aminopurin-6-yl) and N-(purin-6-yl) amino acids and dipeptides *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26 (11): 2645–8.
- Sala C, Hartkoorn RC. Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more. *Future Microbiol.* 2011; 6 (6): 617–33.
- Lechartier B, Rybniker J, Zumla A, Cole ST. Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO Mol Med.* 2014; 6 (2): 158–68.
- Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatosh SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11 (11): 1352–69.
- Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* whole cell screening hits as potential antituberculosis agents. *J Med Chem.* 2013; 56 (20): 7755–60.
- Baulard AR, Betts JC, Engohang-Ndong J, Quan S, McAdam RA, Brennan PJ, et al. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem.* 2000; 275 (36): 28326–31.
- Willand N, Dirie B, Carette X, Bifani P, Singhal A, Desroses M, et al. Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. *Nat Med.* 2009; 15 (5): 537–44.
- Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HW, Neefs JM, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2005; 307 (5707): 223–7.
- Ananthan S, Faaleolea ER, Goldman RC, Hobrath JV, Kwong CD, Laughon BE, et al. High-throughput screening for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis (Edinb).* 2009; 89 (5): 334–53.
- Ballell L, Bates RH, Young RJ, Alvarez-Gomez D, Alvarez-Ruiz E, Barroso V, et al. Fueling open-source drug discovery: 177 small-molecule leads against tuberculosis. *Chem Med Chem.* 2013; 8 (2): 313–21.
- Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003; 7 (1): 6–21.
- Zhang Y, Chiu Chang K, Leung C-C, Wai Yew W, Gicquel B, Fallows D, et al. 'ZS-MDR-TB' versus 'ZR-MDR-TB': improving treatment of MDR-TB by identifying pyrazinamide susceptibility. *Emerg Microbes Infect.* 2012; 1 (7): e5.
- Maslov DA, Zaichikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, et al. Resistance to pyrazinamide in Russian *Mycobacterium tuberculosis* isolates: pncA sequencing versus Bactec MGIT 960. *Tuberculosis (Edinb).* 2015; 95 (5): 608–12.
- Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis.* 2014; 58 (4): 470–80.
- Kaufmann SH, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to

- tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis.* 2017; 56: 263–7.
35. Méndez-Samperio P. Global Efforts in the Development of Vaccines for Tuberculosis: Requirements for Improved Vaccines Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 2016; 84 (4): 204–10.
 36. Andersen P, Kaufmann SH. Novel vaccination strategies against tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4 (6). pii: a018523.
 37. Forrellad MA, Klepp L, Gioffré A, Sabioy García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* 2013; 4 (1): 3–66.
 38. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (13): 5596–601.
 39. Uraga S, Marinova D, Martin C, Aguilo N. Protective Efficacy and Pulmonary Immune Response Following Subcutaneous and Intranasal BCG Administration in Mice. *J Vis Exp.* 2016; 115. DOI: 10.3791/54440.
 40. Zimmermann N, Thormann V, Hu B, Köhler AB, Imai-Matsushima A, Loch C, et al. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO Mol Med.* 2016; 8 (11): 1325–39.
 41. Alvarez N, Infante JF, Borrero R, Mata D, Payan JB, Hossain MM, et al. Histopathological Study of the Lungs of Mice Receiving Human Secretory IgA and Challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Malays J Med Sci.* 2014; 21 (3): 31–7.
 42. Alvarez N, Otero O, Camacho F, Borrero R, Tirado Y, Puig A, et al. Passive administration of purified secretory IgA from human colostrum induces protection against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model of progressive pulmonary infection. *BMC Immunol.* 2013; 14 (Suppl 1): S3.
 43. Savelkoul HFJ, Ferro VA, Strioga MM, Schijns VEJ.C. Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines. *Vaccines (Basel).* 2015; 3 (1): 148–71.
 44. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis.* 1980; 2 (3): 370–83.
 45. Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FD, Smit E, et al. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol.* 1998; 41 (2): 155–67.
 46. Bessler WG, Huber M, Baier W. Bacterial cell wall components as immunomodulators-II. The bacterial cell wall extract OM-85 BV as unspecific activator, immunogen and adjuvant in mice *Int J Immunopharmacol.* 1997; 19 (9–10): 551–8.
 47. López P, González-Rodríguez I, Sánchez B, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine.* 2012; 30 (5): 825–9.
 48. Medina E, Talay SR, Chhatwal GS, Guzmán CA. Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* is a promising adjuvant for antigens delivered by mucosal route. *Eur J Immunol.* 1998; 28 (3): 1069–77.
 49. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol.* 2010; 185 (10): 5677–82.
 50. López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol.* 2010; 138 (1–2): 157–65.
 51. Caselli M, Vaira D, Cassol F, Calò G. Recombinant probiotics and their potential in human health. *Int J Probiotics & Prebiotics.* 2012; 7 (2): 53–8.
 52. Fedorova IA, Danilenko VN. Immunogenic properties of the probiotic component of the microbiota of the gastrointestinal tract. *Biology Bulletin Reviews.* 2014; 134 (2): 99–110.
 53. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol.* 2007 Dec; 150 (3): 531–8.
 54. Khokhlova EV, Smeianov VV, Efimov BA, Kafarskaia LI, Pavlova SI, Shkoporov AN. Anti-inflammatory properties of intestinal *Bifidobacterium* strains isolated from healthy infants. *Microbiol Immunol.* 2012 Jan; 56 (1): 27–39.
 55. Averina OV, Ermolenko EI, Ratushnyi AYU, Tarasova EA, Borshev YuYu, Leontieva G F, i dr. Vlijanie probiotikov na produkciju citokinov v sistemah in vitro i in vivo. *Medicinskaja immunologija.* 2015; 17 (5): 443–54.
 56. Barbieri N, Villena J, Herrera M, Salva S, Alvarez S. Nasally administered *Lactobacillus rhamnosus* accelerate the recovery of humoral immunity in B lymphocyte-deficient malnourished mice. *J Nutr.* 2013 Feb; 143 (2): 227–35.
 57. Tomosada Y, Chiba E, Zelaya H, Takahashi T, Tsukida K, Kitazawa H, et al. Nasally administered *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection. *BMC Immunol.* 2013 Aug; 15 (14): 40.
 58. Leontieva GF, Kramskaya TA, Grabovskaya KB, Philimonova VY, Layno D, Villena D, i dr. Ispol'zovanie laktobacill v kachestve ad'juvantov pri intranazal'noj immunizacii himernej pnevmokokkovoj vakcinoj. *Medicinskaja immunologija.* 2016; 18 (6): 545–54.
 59. Van Overtvelt L, Moussu H, Horiot S, Samson S, Lombardi V, Mascarell L, et al. Lactic acid bacteria as adjuvants for sublingual allergy vaccines. *Vaccine.* 2010 Apr 9; 28 (17): 2986–92.
 60. Harata G, He F, Hiruta N, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, et al. Intranasally administered *Lactobacillus gasseri* TMC0356 protects mice from H1N1 influenza virus infection by stimulating respiratory immune responses. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011; 27 (2): 411–16.
 61. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Apr; 16 (4): 202–13.
 62. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Freboung N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet.* 2015; 47 (3): 242–9.
 63. Mokrousov I. Insights into the Origin, Emergence, and Current Spread of a Successful Russian Clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26 (2): 342–60.
 64. Lyadova IV, Eruslanov EB, Khaidukov SV, Yeremeev VV, Majorov KB, et al. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to *Mycobacterium tuberculosis*-triggered disease. *J Immunol.* 2000 Nov 15; 165 (10): 5921–31.
 65. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Chekalina MS, Danilenko VN. CRISPR-Cas systems of *Mycobacterium tuberculosis*: the structure, evolutionary changes in different lineages, and a possible role in the promotion of virulence and resistance to drugs. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2018; 2: 5–14. DOI: 10.24075/vrgmu.2018.015.
 66. Shitikov E, Bespyatykh J, Ischenko D, Alexeev D, Karpova I, Kostryukova E, et al. Unusual Large-Scale Chromosomal Rearrangements in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 Cluster Isolates. *PLoS One.* 2014; 9 (1): e84971.

ЛИМФОЦИТЫ TH1: КОРРЕЛЯТЫ ПРОТЕКЦИИ ИЛИ МАРКЕРЫ АКТИВНОСТИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ?

И. В. Лядова[✉], А. В. Пантелеев, И. Ю. Никитина, Т. В. Радаева

Лаборатория биотехнологии, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва

Создание новых противотуберкулезных вакцин и разработка методов патогенетической хозяин-ориентированной терапии туберкулеза требуют понимания механизмов, ответственных за протективный противотуберкулезный иммунитет. На протяжении долгого времени основным коррелятом протекции считались антиген-специфичные лимфоциты Th1. Однако со временем накопились сведения, не согласующиеся с этой концепцией. В статье обсуждаются спорные вопросы, касающиеся роли лимфоцитов Th1 в противотуберкулезном иммунитете, и возможности их использования в качестве коррелятов протекции при проведении доклинических и клинических исследований эффективности разрабатываемых вакцинных препаратов.

Ключевые слова: туберкулез, латентная туберкулезная инфекция, лимфоциты Th1, IFN γ

Финансирование: исследование выполнено в рамках темы НИР ФГБНУ «ЦНИИТ» 0515-2015-0010 «Иммунологические методы в диагностике туберкулеза легких».

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Владимировна Лядова
Яузская аллея, д. 2, г. Москва, 107564; ivlyadova@mail.ru

Статья получена: 29.05.2018 **Статья принята к печати:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.036

TH1 LYMPHOCYTES: CORRELATES OF PROTECTION OR MARKERS OF TUBERCULOSIS INFECTION ACTIVITY?

Lyadova IV[✉], Panteleev AV, Nikitina IYu, Radaeva TV

Laboratory of Biotechnology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow

Development of new tuberculosis (TB) vaccines and host-oriented therapy requires understanding mechanisms mediating protective antituberculous immunity. Antigen-specific Th1 lymphocytes have long been considered as the main correlate of TB protection. However, recent data do not confirm this concept. This article discusses debatable issues concerning the role for Th1 lymphocytes in antituberculous immunity, as well as their use as correlates of protection in preclinical and clinical studies assessing the effectiveness of new candidate TB vaccines.

Keywords: tuberculosis, latent tuberculosis infection, Th1 lymphocytes, IFN γ

Funding: the study is part of the Central Tuberculosis Research Institute's stream 0515-2015-0010, "Immunological methods of pulmonary tuberculosis diagnosing".

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Lyadova
Yauzskaya Alley 2, Moscow, 107564; ivlyadova@mail.ru

Received: 29.05.2018 **Accepted:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.036

Несмотря на устойчивое снижение заболеваемости и смертности от туберкулеза в Российской Федерации [1] данное заболевание продолжает оставаться серьезной угрозой, особенно на фоне распространения ВИЧ и туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Есть основания считать, что все большее значение будут приобретать новые факторы, вызывающие нарушение функционирования иммунной системы: рост числа трансплантаций, распространение аутоиммунных и аллергических заболеваний, «старение» населения, снижение физической нагрузки. В этих условиях представляется перспективным использование хозяин-ориентированной терапии, основанной на понимании механизмов формирования и поддержания протективного противотуберкулезного ответа и знании его иммунологических коррелятов. Последнее крайне важно для разработки правильного дизайна доклинических и клинических исследований эффективности предлагаемых вакцинных препаратов. К сожалению, до настоящего времени в научной среде нет единого понимания механизмов противотуберкулезной протекции. В статье обсуждаются имеющиеся противоречия о роли

T-лимфоцитов Th1 в противотуберкулезном иммунитете и влияние этих концепций на тестирование противотуберкулезных вакцин.

Зависимость протективного противотуберкулезного иммунитета от ответа лимфоцитов Th1

С начала проведения исследований в области иммунологии туберкулеза протективный противотуберкулезный иммунитет связывают с антибактериальной активностью макрофагов вследствие их активации лимфоцитами CD4 типа Th1 [2–7]. Данная концепция базируется на большом числе экспериментальных и клинических исследований, основные результаты которых могут быть суммированы следующим образом: дефицит лимфоцитов CD4, отмечаемый у людей с инфекцией ВИЧ или созданный экспериментально (мыши-нокауты по генам CD4, MHC II), приводит к росту риска развития туберкулеза у людей и тяжелому течению экспериментальной туберкулезной инфекции у лабораторных животных [8–12]. Тяжелое течение экспериментальной туберкулезной инфекции и быстрая гибель от нее характерны

также для мышей-нокаут по генам *IFN γ* , *TNF α* , *IL12*, *iNOS* и другим генам, вовлеченным в *IFN γ* -зависимый ответ [13–19]. У детей с мутациями в системе генов *IL12/IFN γ* (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1*, *IRF8*, *ISG15*, *NEMO*, *CYBB*) отмечается предрасположенность к развитию микобактериальных инфекций, в том числе туберкулеза, и их тяжелому течению [20–29]. Повышенный риск развития туберкулеза замечен также у пациентов, находящихся на цитокиновой (анти-TNF) терапии [30, 31]. Антимикобактериальная активность макрофагов мышей зависит от продукции клетками активных форм кислорода и азота, которая в свою очередь активируется под действием цитокинов *IFN γ* и *TNF α* [32–37].

Совокупность приведенных данных легла в основу концепции, согласно которой лимфоциты Th1 являются основными «активаторами» макрофагов и медиаторами протекции при туберкулезной инфекции. Имеющиеся данные указывают, что отсутствие ответа Th1 приводит к развитию туберкулеза, но не означают, что развитие туберкулеза всегда связано с дефицитом ответа Th1. Более того, серии экспериментальных исследований и клинических наблюдений последних лет поставили под сомнение наличие тесной взаимосвязи между развитием туберкулеза и дефицитом Th1/*IFN γ* .

Отсутствие корреляции между уровнем протекции и ответом Th1 в эксперименте

У мышей, вакцинированных БЦЖ и зараженных *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), уровень БЦЖ-индуцированной защиты не был связан с уровнем синтезируемого CD4⁺-лимфоцитами *IFN γ* [38, 39]. В работах нескольких групп было показано, что CD4⁺-лимфоциты, полученные от мышей *IFN γ* ^{-/-} и дифференцированные в Th1-полярных условиях, способны обеспечивать контроль размножения *Mtb* как *in vitro* [40], так и при адаптивном переносе *in vivo* [41, 42]. Таким образом, у мышей контроль над размножением *Mtb* может осуществляться достаточно эффективно и в отсутствие *IFN γ* .

В отличие от контроля над размножением *Mtb*, защита от развития патологических реакций в легочной ткани, по-видимому, требует присутствия *IFN γ* . В работе Nandi & Behar [42] адаптивный перенос CD4⁺ *IFN γ* ^{-/-}-лимфоцитов мышам RAG^{-/-}, инфицированным *Mtb*, защищал реципиентов от размножения *Mtb* так же эффективно, как и перенос лимфоцитов CD4⁺ от мышей дикого типа (продуцирующих *IFN γ*), однако в отличие от последних не защищал мышей от развития патологических реакций в легких и гибели, из чего можно сделать вывод об *IFN γ* как необходимом факторе протекции. Авторы связали протективную активность *IFN γ* с регуляцией воспаления, снижением индукции «патологических» Th17 и нейтрофильной инфильтрации легких. В то же время, в недавних исследованиях группы авторов под руководством D. Barber было продемонстрировано, что чрезмерно высокая продукция *IFN γ* сама по себе может оказывать повреждающий эффект и ускоренную гибель мышей, инфицированных *Mtb* [43, 44].

Таким образом, экспериментальные исследования последних лет свидетельствуют, что роль ответа Th1/*IFN γ* при туберкулезе может быть более сложной, чем «простая» активация антимикобактериальной активности макрофагов, и во многом определяется способностью организма контролировать уровень воспалительных реакций,

развиваемых в ответ на инфекцию. При этом четкой корреляции между уровнем вакцин-индуцированного ответа Th1/*IFN γ* и протекцией против экспериментальной туберкулезной инфекции не выявлено.

Противоречивость сведений о вкладе Th1/*IFN γ* в протективный противотуберкулезный ответ у человека

Несмотря на приведенные выше данные о том, что контроль над размножением *Mtb* у мышей может осуществляться достаточно эффективно и в отсутствие *IFN γ* основная концепция рассматривает *IFN γ* как фактор активации макрофагов и инициатор цепи «*IFN γ* – индукция *iNOS* – продукция активных форм азота – подавление роста *Mtb*». Однако эта цепочка, по-видимому, не характеризует процессы, происходящие в макрофагах человека: по данным нескольких исследовательских групп, в макрофагах человека *IFN γ* не стимулирует образование активных форм азота и не вызывает существенного подавления размножения *Mtb* [33, 45, 46]. Интересно также, что не обнаружено ассоциации между развитием туберкулеза и полиморфизмом генов сигнального пути *IFN γ* (по результатам анализа 20 генов в образцах, полученных от 23 больных туберкулезом и 46 здоровых доноров и анализа экзонов гена *IFNGR1* в 1999 образцах больных туберкулезом и 2589 контрольных образцах) [47].

Один из наиболее распространенных подходов к анализу участия различных иммунных реакций в протективном противотуберкулезном ответе у людей — сопоставление ответа у больных туберкулезом и людей, имевших длительный контакт с больными, но не заболевших туберкулезом (с признаками наличия латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) или без таковых). Результаты подобных сравнительных исследований неоднозначны. В части работ сообщается о пониженном содержании *Mtb*-специфичных лимфоцитов Th1 и пониженном уровне продукции *IFN γ* у больных ТБ, что расценивается как указание на вклад данных типов ответа в защиту от развития ТБ [48–52]. Однако в других работах процентное содержание *IFN γ* -продуцирующих клеток и уровень продукции *IFN γ* и *TNF α* у больных туберкулезом были выше, чем у людей с ЛТИ, контактирующих и здоровых доноров [53–55]. В наших исследованиях уровень антиген-стимулированной продукции *IFN γ* был выше у больных туберкулезом по сравнению с людьми, находящимися в контакте с больными, и людьми с ЛТИ, а также у больных активным туберкулезом по сравнению с пациентами, имеющими остаточные посттуберкулезные изменения в легочной ткани [56]. Нами также было показано, что в группе больных с впервые выявленным туберкулезом по сравнению с людьми с ЛТИ, «контактирующими» и здоровыми донорами выше процентное содержание CD4⁺-лимфоцитов, продуцирующих *IFN γ* и *TNF α* [57]. Снижение ответа Th1 наблюдается, как правило, у больных с длительным течением туберкулезного процесса и, по-видимому, является вторичным [58].

Другим подходом, который можно использовать для оценки вклада реакций иммунитета в протективный противотуберкулезный иммунитет, является сравнение иммунологических параметров у больных туберкулезом с различным течением заболевания. Подход основан на тщательной оценке тяжести проявлений туберкулеза у каждого включенного в исследование пациента. Для оценки тяжести заболевания нами были выбраны следующие его проявления: клиническая форма туберкулеза (туберкулема, инфильтративный, очаговый, кавернозный и фибрино-

кавернозный, диссеминированный), распространенность процесса в легких (количество сегментов и долей легкого, затронутых патологией), степень деструкции легочной ткани (количество и размер очагов деструкции), наличие и уровень бактериовыделения, клиническая тяжесть заболевания (оценивается по температуре и другим признакам интоксикации). В корреляционном и кластерном видах анализа тяжесть указанных проявлений заболевания оказалась не связанной с уровнем ответа Th1 (т. е. процентным и абсолютным содержанием лимфоцитов CD4, продуцирующих IFN γ , TNF α , IL2, их различных комбинаций, уровнем антиген-индуцированной продукции IFN γ в тесте QuantiFERON[®]-TB gold) [56, 57]. Таким образом, можно сделать вывод, что у большинства людей уровень ответа Th1 не влияет ни на исход инфицирования (развитие заболевания или протекцию от него), ни на течение туберкулезного процесса. Это, по-видимому, связано с тем, что в отсутствие грубых дефектов (таких, как существенное снижение количества лимфоцитов CD4 при инфицировании ВИЧ или мутации в генах цепи IL12/IFN γ) организм хозяина способен генерировать ответ Th1 на уровне, достаточном для обеспечения защиты, и количественные индивидуальные различия в уровне данного ответа не оказывают существенного влияния на исход инфицирования.

С данным выводом согласуются и результаты прямых исследований взаимосвязи между вакцинированным уровнем ответа Th1 и эффективностью протективного иммунитета. Так, у детей, вакцинированных БЦЖ при рождении, через 10 недель после вакцинации определяли содержание БЦЖ-специфичных лимфоцитов CD4, CD8 и $\gamma\delta$ -Т-клеток, продуцирующих IFN γ , TNF α , IL2 и IL17 [59]. Последующие наблюдения за вакцинированными в течение двух лет позволили выделить из них группу

детей с неэффективной защитой, у которых развился туберкулез, и группу детей с эффективной протекцией, у которых туберкулез не развился, несмотря на контакт с большими туберкулезом. Указанные группы не различались по процентному содержанию и цитокиновому профилю *Mtb*-специфичных Т-лимфоцитов, возникших в ответ на вакцинацию, из чего авторы сделали вывод, что IFN γ -продуцирующие CD4⁺-лимфоциты, индуцированные вакцинацией БЦЖ, не могут служить маркером эффективности вакцины [59].

ВЫВОДЫ

Имеющиеся данные позволяют сделать вывод, что уровень ответа Th1/IFN γ отражает активность туберкулезного процесса, а не уровень защиты. Это в свою очередь означает, что ответ Th1 не может служить маркером защиты и рассматриваться в качестве показателя, позволяющего хотя бы предварительно оценивать потенциальную эффективность кандидатных вакцин. К сожалению, до настоящего времени оценка ответа Th1 используется в качестве основного (а зачастую единственного) критерия иммуногенности и потенциальной эффективности разрабатываемых противотуберкулезных вакцинных препаратов. Поиск новых маркеров протекции активно продолжается. Ряд работ уже продемонстрировал зависимость вакцинированной защиты от наработки лимфоцитов Th17 [60–63]; в клинических исследованиях в качестве нового коррелята протекции была предложена популяция так называемых неклассических лимфоцитов Th1 [64–66]. Валидация этих данных и поиск других надежных маркеров защиты являются важным условием создания и тестирования противотуберкулезных вакцин.

Литература

1. Нечаева О. Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России в 2016 году. Отчет. М.: Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза. 2017. 69 с.
2. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol*. 2001; 19: 93–129.
3. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 599–623.
4. Kaufmann SH. Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity*. 2006; 24 (4): 351–7.
5. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol. Rev*. 2008; 226: 191–204.
6. Lyadova IV. Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression. In: Pere-Joan Cardona, editor. *Understanding Tuberculosis — Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*. InTech; 2012: 19–42. Available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-analyzing-the-origin-of-mycobacterium-tuberculosis-pathogenicity>.
7. Lyadova IV, Panteleev AV. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm*. 2015; ID 854507.
8. Gallant JE, Ko AH, Joel E. Cavitory pulmonary lesions in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1996; 22: 671–82.
9. Müller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SH. Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect Immun*. 1987; 55 (9): 2037–41.
10. Saunders BM, Cheers C. Inflammatory response following intranasal infection with Mycobacterium avium complex: role of T-cell subsets and gamma interferon. *Infect Immun*. 1995; 63 (6): 2882–87.
11. Ladel CH, Daugelet S, Kaufmann SH. Immune response to Mycobacterium bovis bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur J Immunol*. 1995; 25 (2): 377–84.
12. Flory CM, Hubbard RD, Collins FM. Effects of in vivo T lymphocyte subset depletion on mycobacterial infections in mice. *J Leukoc Biol*. 1992; 51 (3): 225–9.
13. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 1993; 178 (6): 2243–47.
14. Flynn JL. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*. 1993; 178 (6): 2249–54.
15. Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, et al. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guérin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993; 178 (4): 1435–40.
16. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity*. 1995; 2 (6): 561–72.
17. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective

- locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 (10): 5243–8.
18. Cooper AM, Segal BH, Frank AA, Holland SM, Orme IM. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox-/-) mice. *Infect Immun*. 2000; 68 (3): 1231–4.
 19. Jung Y-J, LaCourse R, Ryan L, North RJ. Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide Synthase 2-independent defense in mice. *J Exp Med*. 2002; 196 (7): 991–8.
 20. Scanga CA, Mohan VP, Tanaka K, Alland D, Flynn JL, Chan J. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect Immun*. 2001; 69 (12): 7711–7.
 21. de Jong R, Altare F, Haagen IA, Eiferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, et al. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*. 1998; 280 (5368): 1435–8.
 22. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche MC, Dupuis S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet*. 1999; 21 (4): 370–8.
 23. Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000; 11 (4): 321–33.
 24. Newport M. The genetics of nontuberculous mycobacterial infection. *Expert Rev Mol Med*. 2003; 5 (6): 1–13.
 25. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, et al. IRF8 Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2011; 365 (2): 127–38.
 26. Lee WI, Huang JL, Yeh KW, Jaing TH, Lin TY, Huang YC, et al. Immune defects in active mycobacterial diseases in patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs). *J Formos Med Assoc*. 2011; 110 (12): 750–8.
 27. Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, et al. Mycobacterial disease and impaired IFN γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*. 2012; 337 (6102): 1684–8.
 28. Khan TA, Schimke LF, Amaral EP, Ishfaq M, Barbosa Bonfim CC, Rahman H, et al. Interferon-gamma reduces the proliferation of *M. tuberculosis* within macrophages from a patient with a novel hypomorphic NEMO mutation. *Pediatr Blood Cancer*. 2016; 63 (10): 1863–6.
 29. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN γ immunity. *Semin Immunol*. 2014; 26 (6): 454–70.
 30. Harris J, Keane J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol*. 2010; 161(1): 1–9.
 31. Salgado E, Gómez-Reino JJ. The risk of tuberculosis in patients treated with TNF antagonists. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011; 7 (3): 329–40.
 32. Rose RM, Fuglestad JM, Remington L. Growth Inhibition of *Mycobacterium avium* Complex in Human Alveolar Macrophages by the Combination of Recombinant Macrophage Colony-stimulating Factor and Interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991; 4 (3): 248–54.
 33. Byrd TF. Multinucleated giant cell formation induced by IFN-gamma/IL-3 is associated with restriction of virulent *Mycobacterium tuberculosis* cell to cell invasion in human monocyte monolayers. *Cell Immunol*. 1998; 188 (2): 89–96.
 34. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol*. 1998; 160 (3): 1290–6.
 35. Flesch IE, Kaufmann SH. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect Immun*. 1988; 56 (6): 1464–9.
 36. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med*. 1992. 175 (4): 1111–22.
 37. Yu K, Mitchell C, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR, Chan J. Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: *M. tuberculosis* is resistant to peroxyxynitrite anion. *Tuber Lung Dis*. 1999; 79 (4): 191–8.
 38. Majlessi L, Simsova M, Jarvis Z, Brodin P, Rojas M-J, Bauche C, et al. An increase in antimycobacterial Th1-cell responses by prime-boost protocols of immunization does not enhance protection against tuberculosis. *Infect Immun*. 2006; 74 (4): 2128–37.
 39. Mitrücker H-W, Steinhoff U, Köhler A, Krause M, Lazar D, Mex P, et al. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (30): 12434–9.
 40. Cowley C, Elkins KL. CD4+ T cells mediate IFN γ -independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2003; 171 (9): 4689–99.
 41. Gallegos AM, van Heijst JW, Samstein M, et al., A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of *M. tuberculosis* infection in vivo. *PLoS Pathog*, 2011; 7 (5): e1002052.
 42. Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Exp Med*. 2011; 208 (11): 2251–62.
 43. Barber DL, Mayer-Barber KD, Feng CG, Sharpe AH, Sher A. CD4 T Cells Promote Rather than Control Tuberculosis in the Absence of PD-1-Mediated Inhibition. *J Immunol*. 2011; 186 (3): 1598–607.
 44. Sakai S, Kauffman KD, Sallin MA, Sharpe AH, Young HA, Ganusov VV, et al. CD4 T Cell-Derived IFN γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease. *PLoS Pathog*. 2016; 12 (5): e1005667.
 45. Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology*. 1986; 59 (3): 333–8.
 46. Bermudez LE. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin Exp Immunol*. 1993; 91 (2): 277–81.
 47. Meyer CG, Intemann CD, Förster B, Owusu-Dabo E, Franke A, Horstmann RD, Thye T. No significant impact of IFN γ pathway gene variants on tuberculosis susceptibility in a West African population. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24 (5): 748–55.
 48. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun*. 2007; 75 (2): 820–9.
 49. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, et al. Depressed T-Cell Interferon- γ Responses in Pulmonary Tuberculosis: Analysis of Underlying Mechanisms and Modulation with Therapy. *J Infect Dis*. 1999; 180 (6): 2069–73.
 50. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Dojki M, Irfan M, et al. Differential live *Mycobacterium tuberculosis*-, *M. bovis* BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16 (7): 991–8.
 51. Martinez V, Carcelain G, Badell E, Jouan M, Mauger I, Sellier P, et al. T-cell and serological responses to Erp, an exported *Mycobacterium tuberculosis* protein, in tuberculosis patients and healthy individuals. *BMC Infect Dis*. 2007; 7: 83.
 52. Rueda CM, Marín ND, García LF, Rojas M. Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN γ in human latent and active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010; 90 (6): 346–53.
 53. Morosini M, Meloni F, Marone Bianco A, Paschetto E, Uccelli M, Pozzi E, et al. The assessment of IFN-gamma and its regulatory cytokines in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003; 7 (10): 994–1000.
 54. Verbon A, Juffermans N, Van Deventer SJH, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der Poll T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin*

- Exp Immunol. 1999; 115 (1): 110–3.
55. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, Di Liberto D, de Boer T, Adnan I, et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007; 87 (4): 312–21.
 56. Nikitina IY, Pantelev A V., Sosunova E V., Karpina NL, Bagdasarian TR, Burmistrova IA, et al. Antigen-Specific IFN γ Responses Correlate with the Activity of *M. tuberculosis* Infection but Are Not Associated with the Severity of Tuberculosis Disease. *J Immunol Res*. 2016; 2016 (Recent Advances in the Host Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection): 1–9.
 57. Pantelev AV, Nikitina IY, Burmistrova IA, Kosmiadi GA, Radaeva TV, Amanshedov RB, et al. Severe Tuberculosis in Humans Correlates Best with Neutrophil Abundance and Lymphocyte Deficiency and Does Not Correlate with Antigen-Specific CD4 T-Cell Response. *Front Immunol*. 2017; 8: 1–16.
 58. Tan Q, Xie WP, Min R, Dai GQ, Xu CC, Pan HQ, et al. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31 (6): 1233–42.
 59. Kagina BMN, Abel B, Scriba TJ, Hughes EJ, Keyser A, Soares A, et al. Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182 (8): 1073–9.
 60. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin infection. *J Immunol*. 2007; 178 (6): 3786–96.
 61. Gopal R, Lin Y, Obermajer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, Kalinski P, Khader SA. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Eur J Immunol*. 2012; 42 (2): 364–73.
 62. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*. 2007; 8 (4): 369–77.
 63. Griffiths KL, Pathan AA, Minassian AM, Sander CR, Beveridge NER, Hill AVS, Fletcher HA, McShane H. Th1/Th17 Cell Induction and Corresponding Reduction in ATP Consumption following Vaccination with the Novel *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine MVA85A. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e23463.
 64. Arlehamn CL, Seumois G, Gerasimova A, Huang C, Fu Z, Yue X, et al. Transcriptional profile of tuberculosis antigen-specific T cells reveals novel multifunctional features. *J Immunol*. 2014; 193 (6): 2931–40.
 65. Strickland N, Müller TL, Berkowitz N, Goliath R, Carrington MN, Wilkinson RJ, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Cells Using MHC Class II Tetramers Reveals Phenotypic Differences Related to HIV Infection and Tuberculosis Disease. *J Immunol*. 2017; 199 (7): 2440–50.
 66. Nikitina IY, Pantelev AV, Kosmiadi GA, Serdyuk YV, Nenashva TA, Nikolaev AA, et al. Th1, Th17, and Th1Th17 Lymphocytes during Tuberculosis: Th1 Lymphocytes Predominate and Appear as Low-Differentiated CXCR3 + CCR6 + Cells in the Blood and Highly Differentiated CXCR3 +/- CCR6 - Cells in the Lung. *J Immunol*. 2018; 200 (6): 2090–103.

References

1. Nechaeva O. B. Jepidemičeskaja situacija po tuberkulezu v Rossii v 2016 godu. *Otchet. M.: Federal'nyj Centr monitoringa protivodejstvija rasprostranjeniju tuberkuleza*. 2017. 69 s.
2. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol*. 2001; 19: 93–129.
3. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 599–623.
4. Kaufmann SH. Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity*. 2006; 24 (4): 351–7.
5. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol. Rev*. 2008; 226: 191–204.
6. Lyadova IV. Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression. In: Pere-Joan Cardona, editor. *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*. InTech; 2012: 19–42. Available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-analyzing-the-origin-of-mycobacterium-tuberculosis-pathogenicity>.
7. Lyadova IV, Pantelev AV. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm*. 2015; ID 854507.
8. Gallant JE, Ko AH, Joel E. Cavitory pulmonary lesions in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1996; 22: 671–82.
9. Müller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SH. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cells. *Infect Immun*. 1987; 55 (9): 2037–41.
10. Saunders BM, Cheers C. Inflammatory response following intranasal infection with *Mycobacterium avium* complex: role of T-cell subsets and gamma interferon. *Infect Immun*. 1995; 63 (6): 2282–87.
11. Ladel CH, Daugelat S, Kaufmann SH. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur J Immunol*. 1995; 25 (2): 377–84.
12. Flory CM, Hubbard RD, Collins FM. Effects of in vivo T lymphocyte subset depletion on mycobacterial infections in mice. *J Leukoc Biol*. 1992; 51 (3): 225–9.
13. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 1993; 178 (6): 2243–47.
14. Flynn JL. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993; 178 (6): 2249–54.
15. Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, et al. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guérin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993; 178 (4): 1435–40.
16. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995; 2 (6): 561–72.
17. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 (10): 5243–8.
18. Cooper AM, Segal BH, Frank AA, Holland SM, Orme IM. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox-/-) mice. *Infect Immun*. 2000; 68 (3): 1231–4.
19. Jung Y-J, LaCourse R, Ryan L, North RJ. Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide Synthase 2-independent defense in mice. *J Exp Med*. 2002; 196 (7): 991–8.
20. Scanga CA, Mohan VP, Tanaka K, Alland D, Flynn JL, Chan J. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect Immun*. 2001; 69 (12): 7711–7.
21. de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda

- Vriesman PJ, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*. 1998; 280 (5368): 1435–8.
22. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet*. 1999; 21 (4): 370–8.
 23. Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000; 11 (4): 321–33.
 24. Newport M. The genetics of nontuberculous mycobacterial infection. *Expert Rev Mol Med*. 2003; 5 (6): 1–13.
 25. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, et al. IRF8 Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2011; 365 (2): 127–38.
 26. Lee WI, Huang JL, Yeh KW, Jaing TH, Lin TY, Huang YC, et al. Immune defects in active mycobacterial diseases in patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs). *J Formos Med Assoc*. 2011; 110 (12): 750–8.
 27. Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, et al. Mycobacterial disease and impaired IFN γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*. 2012; 337 (6102): 1684–8.
 28. Khan TA, Schimke LF, Amaral EP, Ishfaq M, Barbosa Bonfim CC, Rahman H, et al. Interferon-gamma reduces the proliferation of *M. tuberculosis* within macrophages from a patient with a novel hypomorphic NEMO mutation. *Pediatr Blood Cancer*. 2016; 63 (10): 1863–6.
 29. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN γ immunity. *Semin Immunol*. 2014; 26 (6): 454–70.
 30. Harris J, Keane J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol*. 2010; 161(1): 1–9.
 31. Salgado E, Gómez-Reino JJ. The risk of tuberculosis in patients treated with TNF antagonists. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011; 7 (3): 329–40.
 32. Rose RM, Fuglestad JM, Remington L. Growth Inhibition of *Mycobacterium avium* Complex in Human Alveolar Macrophages by the Combination of Recombinant Macrophage Colony-stimulating Factor and Interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991; 4 (3): 248–54.
 33. Byrd TF. Multinucleated giant cell formation induced by IFN-gamma/IL-3 is associated with restriction of virulent *Mycobacterium tuberculosis* cell to cell invasion in human monocyte monolayers. *Cell Immunol*. 1998; 188 (2): 89–96.
 34. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol*. 1998; 160 (3): 1290–6.
 35. Flesch IE, Kaufmann SH. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun*. 1988; 56 (6): 1464–9.
 36. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med*. 1992. 175 (4): 1111–22.
 37. Yu K, Mitchell C, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR, Chan J. Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: *M. tuberculosis* is resistant to peroxynitrite anion. *Tuber Lung Dis*. 1999; 79 (4): 191–8.
 38. Majlessi L, Simsova M, Jarvis Z, Brodin P, Rojas M-J, Bauche C, et al. An increase in antimycobacterial Th1-cell responses by prime-boost protocols of immunization does not enhance protection against tuberculosis. *Infect Immun*. 2006; 74 (4): 2128–37.
 39. Mittrücker H-W, Steinhoff U, Köhler A, Krause M, Lazar D, Mex P, et al. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (30): 12434–9.
 40. Cowley C, Elkins KL. CD4+ T cells mediate IFN γ -independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2003; 171 (9): 4689–99.
 41. Gallegos AM, van Heijst JW, Samstein M, et al., A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of *M. tuberculosis* infection in vivo. *PLoS Pathog*, 2011; 7 (5): e1002052.
 42. Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Exp Med*. 2011; 208 (11): 2251–62.
 43. Barber DL, Mayer-Barber KD, Feng CG, Sharpe AH, Sher A. CD4 T Cells Promote Rather than Control Tuberculosis in the Absence of PD-1-Mediated Inhibition. *J Immunol*. 2011; 186 (3): 1598–607.
 44. Sakai S, Kauffman KD, Sallin MA, Sharpe AH, Young HA, Ganusov VV, et al. CD4 T Cell-Derived IFN γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease. *PLoS Pathog*. 2016; 12 (5): e1005667.
 45. Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology*. 1986; 59 (3): 333–8.
 46. Bermudez LE. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin Exp Immunol*. 1993; 91 (2): 277–81.
 47. Meyer CG, Intemann CD, Förster B, Owusu-Dabo E, Franke A, Horstmann RD, Thye T. No significant impact of IFN γ pathway gene variants on tuberculosis susceptibility in a West African population. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24 (5): 748–55.
 48. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun*. 2007; 75 (2): 820–9.
 49. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, et al. Depressed T-Cell Interferon- γ Responses in Pulmonary Tuberculosis: Analysis of Underlying Mechanisms and Modulation with Therapy. *J Infect Dis*. 1999; 180 (6): 2069–73.
 50. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Dojki M, Irfan M, et al. Differential live *Mycobacterium tuberculosis*-, *M. bovis* BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16 (7): 991–8.
 51. Martinez V, Carcelain G, Badell E, Jouan M, Mauger I, Sellier P, et al. T-cell and serological responses to Erp, an exported *Mycobacterium tuberculosis* protein, in tuberculosis patients and healthy individuals. *BMC Infect Dis*. 2007; 7: 83.
 52. Rueda CM, Marín ND, García LF, Rojas M. Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN γ in human latent and active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010; 90 (6): 346–53.
 53. Morosini M, Meloni F, Marone Bianco A, Paschetto E, Uccelli M, Pozzi E, et al. The assessment of IFN-gamma and its regulatory cytokines in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003; 7 (10): 994–1000.
 54. Verbon A, Juffermans N, Van Deventer SJH, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der Poll T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol*. 1999; 115 (1): 110–3.
 55. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, Di Liberto D, de Boer T, Adnan I, et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007; 87 (4): 312–21.
 56. Nikitina IY, Panteleev A V., Sosunova E V., Karpina NL, Bagdasarian TR, Burmistrova IA, et al. Antigen-Specific IFN γ Responses Correlate with the Activity of *M. tuberculosis* Infection but Are Not Associated with the Severity of Tuberculosis Disease. *J Immunol Res*. 2016; 2016 (Recent Advances in the Host Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection): 1–9.
 57. Panteleev AV, Nikitina IY, Burmistrova IA, Kosmiadi GA, Radaeva TV, Amansahedov RB, et al. Severe Tuberculosis in Humans

- Correlates Best with Neutrophil Abundance and Lymphocyte Deficiency and Does Not Correlate with Antigen-Specific CD4 T-Cell Response. *Front Immunol.* 2017; 8: 1–16.
58. Tan Q, Xie WP, Min R, Dai GQ, Xu CC, Pan HQ, et al. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31 (6): 1233–42.
 59. Kagina BMN, Abel B, Scriba TJ, Hughes EJ, Keyser A, Soares A, et al. Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182 (8): 1073–9.
 60. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin infection. *J Immunol.* 2007; 178 (6): 3786–96.
 61. Gopal R, Lin Y, Obermajer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, Kalinski P, Khader SA. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Eur J Immunol.* 2012; 42 (2): 364–73.
 62. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol.* 2007; 8 (4): 369–77.
 63. Griffiths KL, Pathan AA, Minassian AM, Sander CR, Beveridge NER, Hill AVS, Fletcher HA, McShane H. Th1/Th17 Cell Induction and Corresponding Reduction in ATP Consumption following Vaccination with the Novel *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine MVA85A. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e23463.
 64. Arlehamn CL, Seumois G, Gerasimova A, Huang C, Fu Z, Yue X, et al. Transcriptional profile of tuberculosis antigen-specific T cells reveals novel multifunctional features. *J Immunol.* 2014; 193 (6): 2931–40.
 65. Strickland N, Müller TL, Berkowitz N, Goliath R, Carrington MN, Wilkinson RJ, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Cells Using MHC Class II Tetramers Reveals Phenotypic Differences Related to HIV Infection and Tuberculosis Disease. *J Immunol.* 2017; 199 (7): 2440–50.
 66. Nikitina IY, Panteleev AV, Kosmiadi GA, Serdyuk YV, Nenasheva TA, Nikolaev AA, et al. Th1, Th17, and Th1Th17 Lymphocytes during Tuberculosis: Th1 Lymphocytes Predominate and Appear as Low-Differentiated CXCR3 + CCR6 + Cells in the Blood and Highly Differentiated CXCR3 +/- CCR6 - Cells in the Lung. *J Immunol.* 2018; 200 (6): 2090–103.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МУТАНТОВ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*, УСТОЙЧИВЫХ К СОЕДИНЕНИЯМ КЛАССА ЗАМЕЩЕННЫХ ИМИДАЗО[1,2-*b*][1,2,4,5] ТЕТРАЗИНОВ – КАНДИДАТОВ В ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Д. А. Маслов¹✉, О. Б. Беккер¹, К. В. Шур¹, А. А. Ватлин¹, А. В. Коротина², В. Н. Даниленко¹

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

² Лаборатория гетероциклических соединений, Институт органического синтеза имени И. Я. Пастовского, Екатеринбург

Распространение штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью требует разработки новых противотуберкулезных препаратов. Ранее нами были исследованы соединения класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов, показавшие способность ингибировать серин-треониновые протеинкиназы в оригинальной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII+*. Для определения механизма действия кандидатов в лекарственные препараты необходимо исследование мутаций в геноме микобактерий, приводящих к устойчивости к этим препаратам. Целью работы было найти и охарактеризовать мутации, определяющие устойчивость штаммов *M. smegmatis*. Проводили полногеномное секвенирование девяти мутантов, устойчивых к трем соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов. В семи из девяти мутантных штаммов обнаружена мутация (Y52H) в гене *MSMEG_1601*, кодирующем белок с неизвестной функцией и являющемся консервативным для микобактерий, причем в трех штаммах дополнительно обнаружены две мутации в гене *MSMEG_1380*, кодирующем транскрипционный регулятор. В двух оставшихся мутантных штаммах обнаружены мутации в генах *MSMEG_0641* и *MSMEG_2087*, кодирующих белки-транспортеры. Мутаций в генах, кодирующих СТПК, обнаружено не было. Вероятно, они не являются основными мишенями исследуемых соединений. Дальнейшее изучение функции белка *MSMEG_1601* представляет интерес в случае, если этот белок является новой биомшенью, либо частью нового механизма реализации устойчивости к потенциальным противотуберкулезным препаратам.

Ключевые слова: *Mycobacterium smegmatis*, лекарственная устойчивость, мутации устойчивости, полногеномное секвенирование, замещенные имидазотетразины, туберкулез

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20060).

Благодарности: авторы выражают благодарность Наталье Михеечевой за ценные советы и методические наработки.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Антонович Маслов
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119333; d.masssik@gmail.com

Статья получена: 30.05.2018 **Статья принята к печати:** 12.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.039

WHOLE-GENOME SEQUENCING AND COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* MUTANTS RESISTANT TO IMIDAZO[1,2-*b*][1,2,4,5]TETRAZINES, ANTITUBERCULOSIS DRUG CANDIDATES

Maslov DA¹✉, Bekker OB¹, Shur KV¹, Vatlin AA¹, Korotina AV², Danilenko VN¹

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

² Laboratory of Heterocyclic Compounds, Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ekaterinburg, Russia

The spread of multidrug and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* urges the development of novel antituberculosis drugs. Previously, we studied the compounds representing the class of substituted imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5] tetrazines capable of inhibiting serine/threonine protein kinases (STPK) in the original *M. smegmatis* *aphVIII+* test-system. To unveil the mechanism of action of drug candidates, it is necessary to search for mutations in the mycobacterial genome that confer resistance to these compounds. The aim of our work was to find and describe such mutations in *M. smegmatis* strains. We carried out the whole-genome sequencing of 9 mutants resistant to 3 imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines. Seven of 9 mutant strains were found to have the Y52H mutation in the highly conserved mycobacterial gene *MSMEG_1601* encoding a protein with an unknown function. Additionally, three of those 7 strains were shown to have two mutations in the *MSMEG_1380* encoding a transcriptional regulator. The remaining 2 mutant strains had mutations in *MSMEG_0641* and *MSMEG_2087* genes encoding transporter-proteins. No mutations were found in STPK genes, meaning that they might be not the primary targets of the studied compounds. Further investigation of *MSMEG_1601* function may be of interest as this protein might be the biological target or a part of a new mechanism underlying resistance to antituberculosis drug candidates.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*, drug resistance, resistance mutations, whole-genome sequencing, substituted imidazotetrazines, tuberculosis

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Grant 17-75-20060).

Acknowledgement: the authors wish to thank Natalya Mikhecheva of the Laboratory of Bacterial Genetics, Vavilov Institute of General Genetics, for her valuable comments and methodological know-how.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry A. Maslov
Gubkina 3, Moscow, 119333; d.masssik@gmail.com

Received: 30.05.2018 **Accepted:** 12.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.039

Туберкулез — одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний: по оценкам Всемирной организации здравоохранения более 2 млрд человек в мире являются носителями его возбудителя — *Mycobacterium tuberculosis*. Ежегодно от туберкулеза умирает около 10,8 млн человек [1]. Основной проблемой контроля за заболеванием на сегодняшний день является возникновение и повсеместное распространение штаммов *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ — устойчивость к рифампицину и изониазиду; ШЛУ — дополнительная к МЛУ устойчивость к препаратам ряда фторхинолонов и одному из инъекционных препаратов второго ряда противотуберкулезной терапии) [2, 3]. Таким образом, одной из главных задач в борьбе с туберкулезом является разработка противотуберкулезных препаратов с новым механизмом действия.

Ранее нами была исследована антимикобактериальная активность соединений класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов [4], которые также проявили активность в оригинальной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII+*, валидированной для поиска ингибиторов микобактериальных серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) [5]. Однако для окончательного подтверждения механизма действия замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов, а также механизма возникновения устойчивости к данным соединениям требовалось обнаружить мутации, приводящие к устойчивости микобактерий к этим веществам с использованием *M. smegmatis* в качестве модельного организма [6].

Целью данного исследования было секвенирование и сравнительный геномный анализ мутантов *M. smegmatis*, устойчивых к трем соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов: TSV-395, TSV-402 и NIK-1283.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микобактерий и условия культивирования

В работе использованы следующие штаммы микобактерий: 1) *M. smegmatis* *mc2* 155 (штамм дикого типа); 2) штаммы *M. smegmatis* *at^R8*, *at^R9*, *at^R10*, отобранные как устойчивые к соединению TSV-395; 3) штаммы *M. smegmatis* *at^R1*, *at^R2*, *at^R11*, отобранные как устойчивые к соединению TSV-402; 4) штаммы *M. smegmatis* *at^R14*, *at^R17*, *at^R19*, отобранные как устойчивые к соединению NIK-1283. Используемые мутантные штаммы имели перекрестную лекарственную устойчивость ко всем трем соединениям.

Культуры микобактерий выращивали в жидкой среде Middlebrook 7H9 (Himedia, Индия) с добавлением OADC (Himedia, Индия), 0,1% Tween-80 и 0,1% глицерина при 37 °C и 250 об./мин.

Выделение ДНК микобактерий и полногеномное секвенирование

ДНК микобактерий очищали из 15 мл жидкой культуры по методике, описанной в [7]. После предварительной очистки ДНК обрабатывали РНКазой А (ThermoFischerScientific, США) и проводили экстракцию смесью из фенола, хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 25 : 24 : 1 по объему.

Очищенную ДНК использовали для приготовления библиотек с набором реагентов Nextera (Illumina, США)

и дальнейшего секвенирования на платформе Illumina MiSeq с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 2x315 bp (Illumina, США). ДНК штамма дикого типа секвенировали с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v2 2x150 bp (Illumina, США). Полученные данные были добавлены в базу данных Sequence Read Archive (SRA) NCBI, номер записи: SRP145443.

Обработка данных полногеномного секвенирования и сравнительный геномный анализ

Полученные прочтения выравнивали при помощи программы BWA-MEM [8] на референсный геном (NC_008596.1, PRJNA57701), затем создавали файл multiple pileup при помощи команды mpileup программы SAMtools [9] с опциями (-B -f). Определение однонуклеотидных замен выполняли командой mpileup2snp программы VarScan 2.3.9 [10] с опциями (--min-avg-qual 30 --min-var-freq 0.80 --p-value 0.01 --output-vcf 1). Для аннотации использовали скрипт vcf_annotate.pl, любезно предоставленный сотрудницей лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики им. Н. И. Вавилова Натальей Михеевской. Затем отбирали однонуклеотидные замены, не присутствующие в штамме дикого типа и находящиеся внутри открытых рамок считывания. Поиск гомологов проводили в программе BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный геномный анализ

После сборки геномов был проведен сравнительный геномный анализ мутантных штаммов и штамма дикого типа, который выявил следующие уникальные однонуклеотидные замены:

1) замену CGT>AGT в кодоне 233 (R>S) гена *MSMEG_0641* (binding-protein-dependent transporters inner membrane component) у мутанта *at^R10*;

2) замену ACG>GTG в кодоне 52 (T>V) гена *MSMEG_1380* (transcriptional regulator) у мутантного штамма *at^R19*;

3) инсерции аминокислот VG в позиции 51 гена *MSMEG_1380* (transcriptional regulator) у мутантных штаммов *at^R11*, *at^R17*;

4) замену TAC>CAC в кодоне 52 (Y>H) гена *MSMEG_1601* (hypothetical protein) у мутантных штаммов *at^R1*, *at^R2*, *at^R8*, *at^R11*, *at^R14*, *at^R17* и *at^R19*;

5) замену TAC>TGC в кодоне 188 (Y>C) гена *MSMEG_2087* (transporter small conductance mechanosensitive ion channel (MscS) family protein) у мутантного штамма *at^R9*.

Гены, в которых найдены перечисленные мутации, не являются псевдогенами, однако функции кодируемых ими белков экспериментально не подтверждены.

Идентификация генов-гомологов в геноме *M. tuberculosis*

При помощи BLAST удалось выявить гомологи белков *M. tuberculosis*, несущих обнаруженные мутации (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение механизма действия препарата является важнейшим этапом в разработке любого современного антибактериального лекарства. Получение мутантов, устойчивых к разрабатываемому соединению и выявление определяющих устойчивость мутаций — классический

Таблица. Характеристики ближайших гомологов для белков *M. tuberculosis*, в которых были обнаружены мутации, предположительно определяющие лекарственную устойчивость

Белок	Семейство	Функция	Ближайший гомолог у <i>M. tuberculosis</i> (продукт гена)	Сходство по аминокислотной последовательности (%)	Покрывание аминокислотной последовательности (%)
MSMEG_0641	DppC ABC-транспортеры	Транспорт аминокислот и неорганических соединений	<i>dppB</i> (<i>rv3665c</i>)	35	98
MSMEG_1380	AcrR/TetR_N	Транскрипционные регуляторы	<i>rv0067c</i>	33	71
MSMEG_1601	Неизвестно	Неизвестно	<i>rv3412c</i>	87	100
MSMEG_2087	MscS	Механочувствительные ионные каналы	<i>rv3104c</i>	69	89

подход к установлению наиболее вероятных мишеней воздействия антибиотика. Нами проведен сравнительный геномный анализ девяти мутантов, устойчивых к соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов (полученных на трех различных соединениях, но имеющих к ним перекрестную устойчивость). Анализ генома мутантов позволил выбрать в качестве наиболее вероятных драйверов лекарственной устойчивости пять мутаций в четырех генах.

Две мутации обнаружены в генах, кодирующих трансмембранный транспортер (MSMEG_0641) и механочувствительный канал (MSMEG_2087), и могут влиять на транспорт соединений внутрь клетки и из нее. Две мутации обнаружены в гене белка MSMEG_1380, являющемся транскрипционным регулятором семейства TetR. Белки этого семейства могут участвовать в регуляции лекарственной устойчивости путем контроля экспрессии различных мембранных транспортеров. Так, у *M. abscessus* регулятор TetR-семейства активирует экспрессию клеточных транспортеров MmpS5/MmpL5, связанных с реализацией лекарственной устойчивости к производным тиацетазона [11].

Из обнаруженных мутаций наиболее интересной для дальнейших исследований представляется мутация в гене MSMEG_1601; она встречается у семи из девяти мутантов. Данный ген крайне консервативен для рода *Mycobacterium*: он присутствует в геномах всех

микобактерий (и ряда других актинобактерий), включая сильно редуцированный геном *M. leprae*, и относится к так называемым core hypotheticals — высококонсервативным белкам с неопределенной функцией [12] (хотя не является жизненно-необходимым для роста микобактерий *in vitro* [13]). Протеомный анализ штаммов *M. tuberculosis* различных линий показал, что белок Rv3412 (гомолог MSMEG_1601) присутствует в увеличенном количестве в вирулентных штаммах, в частности в штамме линии LAM, в сравнении с аттенуированным штаммом *M. bovis* BCG. Это позволило авторам сделать предположение о возможном участии данного белка в инфекционном процессе [14].

Выводы

Нами обнаружено пять мутаций в четырех генах, вероятно приводящих к устойчивости микобактерий к соединениям класса замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов. Участие каждой из мутаций еще предстоит подтвердить методами обратной генетики, однако уже сейчас большой интерес представляет ген, кодирующий белок MSMEG_1601: в отличие от других выявленных мутантных генов он не связан с трансмембранным транспортом и может служить прямой биомишенью замещенных имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов.

Литература

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva; 2017. p. 1–262.
- Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*. 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
- Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*; 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
- Maslov DA, Shur KV, Vattin AA, Bekker OB, Korotina AV, Rusinov GL, et al. Search for azolo[1,2,4,5]tetrazines biotargets in mycobacteria. 43rd FEBS Congress Proceedings. FEBS OpenBio 2018; 8: 263–263 Suppl. 1 Meeting Abstract: p. 09–172–M.
- Маслов Д. А., Беккер О. Б., Алексеева М. Г., Князева Л. М., Мавлетова Д. А., Афанасьев И. И. и др. Ингибиторы серин-треониновых протеинкиназ классов аминопиридинов и аминопиримидинов — кандидаты в препараты для лечения лекарственно устойчивых форм туберкулеза. *Вестник РГМУ*. 2017; (1): 42–7. DOI: 10.24075/brsmu.2017-01-04.
- Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. *J Med Chem*. 2013 Oct 24;56 (20): 7755–60.
- Belisle JT, Mahaffey SB, Hill PJ. Isolation of *Mycobacterium* Species Genomic DNA. *Mycobacteria Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 1–12.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010 Mar 1; 26 (5): 589–95. PMID: PMC2828108.
- Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011 Nov 1; 27 (21): 2987–93. PMID: PMC3198575.
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012 Mar; 22 (3): 568–76. PMID: PMC3290792.
- Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen AJ, Ghigo E, Blaise M, Kremer L. Mechanistic and Structural Insights Into the Unique TetR-Dependent Regulation of a Drug Efflux Pump in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol Frontiers*. 2018; 9: 649. PMID: PMC5895659.
- Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, et al. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial “core” genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. *Microbiol Society*; 2004 Feb; 150 (Pt 2): 483–96.
- Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial

growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol.* 2003 Apr; 48 (1): 77–84.

14. Peters JS, Calder B, Gonnelli G, Degroev S, Rajaonarifara E, Mulder N, et al. Identification of Quantitative Proteomic

Differences between *Mycobacterium tuberculosis* Lineages with Altered Virulence. *Front Microbiol.* 2016; 7 (139): 813. PMID: PMC4885829.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva; 2017. p. 1–262.
2. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet.* 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
3. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
4. Maslov DA, Shur KV, Vatlin AA, Bekker OB, Korotina AV, Rusinov GL, et al. Search for azolo[1,2,4,5]tetrazines biotargets in mycobacteria. 43rd FEBS Congress Proceedings. *FEBS OpenBio* 2018; 8: 263–263 Suppl. 1 Meeting Abstract: p. 09–172–M.
5. Maslov DA, Bekker OB, Alekseeva MG, Kniazeva LM, Mavletova DA, Afanasyev II, et al. Aminopyridine- and aminopyrimidine-based serine/threonine protein kinase inhibitors are drug candidates for treating drug-resistant tuberculosis. *Bulletin of RSMU.* 2017 Feb 28;(1):38–43. DOI: 10.24075/brsmu.2017-01-04.
6. Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. *J Med Chem.* 2013 Oct 24;56 (20): 7755–60.
7. Belisle JT, Mahaffey SB, Hill PJ. Isolation of *Mycobacterium* Species Genomic DNA. *Mycobacteria Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 1–12.
8. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010 Mar 1; 26 (5): 589–95. PMID: PMC2828108.
9. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics.* 2011 Nov 1; 27 (21): 2987–93. PMID: PMC3198575.
10. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012 Mar; 22 (3): 568–76. PMID: PMC3290792.
11. Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen AJ, Ghigo E, Blaise M, Kremer L. Mechanistic and Structural Insights Into the Unique TetR-Dependent Regulation of a Drug Efflux Pump in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol Frontiers.* 2018; 9: 649. PMID: PMC5895659.
12. Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, et al. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial “core” genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology. Microbiol Society.* 2004 Feb; 150 (Pt 2): 483–96.
13. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol.* 2003 Apr; 48 (1): 77–84.
14. Peters JS, Calder B, Gonnelli G, Degroev S, Rajaonarifara E, Mulder N, et al. Identification of Quantitative Proteomic Differences between *Mycobacterium tuberculosis* Lineages with Altered Virulence. *Front Microbiol.* 2016; 7 (139): 813. PMID: PMC4885829.

СОЗДАНИЕ ВЫБОРКИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ЛИНИИ BEIJING-B0 И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДИКТОРОВ ИММУННОЙ ДИСФУНКЦИИ ПАЦИЕНТОВ-ИСТОЧНИКОВ

К. В. Шур¹✉, Т. В. Умпелева², О. Б. Беккер¹, Д. А. Маслов¹, М. В. Зайчикова¹, Д. В. Вахрушева², В. Н. Даниленко¹

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

² Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний (филиал Уральского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии), Екатеринбург

Эволюция *Mycobacterium tuberculosis* привела к появлению различных географически-ассоциированных линий бактерий, обладающих уникальными фенотипами и генотипами. Так, наиболее распространенные в мире генотипические линии Beijing и LAM проявляют высокий уровень вирулентности и трансмиссивности по сравнению с референтными штаммами *M. tuberculosis*. Однако за последние 50 лет, в результате массового применения антибиотиков, произошел очередной скачок эволюции, приведший к возникновению эпидемиологически опасных сублиний: Beijing-B0 в России, Beijing-modern-4 в Китае и KZN в ЮАР. Целью работы было исследование влияния предикторов иммунной дисфункции пациентов на тяжесть протекания туберкулезной инфекции при инфицировании *M. tuberculosis* Beijing-B0. Проводили отбор пациентов с впервые выявленным туберкулезом, вызванным *M. tuberculosis* Beijing-B0, анализировали анамнез каждого пациента-источника на предмет наличия заболеваний/состояний, вызывающих снижение иммунитета, а также определяли иммунограмму. В результате работы связи исследованных нами характеристик инфекционного процесса с состоянием иммунной системы пациента не обнаружено.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, вирулентность, лекарственная устойчивость, иммунокомпрометация, Beijing-B0/W148

Финансирование: работа была выполнена в рамках проекта Министерства науки и Высшего образования России № RFMEFI61317X0068 «Роль регион-специфичных полиморфизмов генов вирулентности в формировании лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*».

✉ **Для корреспонденции:** Кирилл Владимирович Шур
ул. Губкина, 3, г. Москва, 119333; shurkirill@gmail.com

Статья получена: 02.06.2018 **Статья принята к печати:** 14.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.040

COMPILATION OF THE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING-B0 LINEAGE SAMPLE AND IDENTIFYING PREDICTORS OF IMMUNE DYSFUNCTION IN SOURCE PATIENTS

Shur KV¹✉, Umpeleva TV², Bekker OB¹, Maslov DA¹, Zaychikova MV¹, Vakhrusheva DV², Danilenko VN¹

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

² National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases (branch of the Ural Research Institute for Phthisiopulmonology), Ekaterinburg

Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* have lead to the development of a number of lineages that have unique phenotypes and genotypes and are associated with certain geographical regions. Thus, compared to the reference strains of *M. tuberculosis*, Beijing and LAM genotypic lineages, which are the most common in the world, are highly virulent and transmissible. However, the extensive use of antibiotics over the past 50 years has caused the next evolutionary leap, which yielded new, epidemiologically dangerous sublineages: Beijing-B0 in Russia, Beijing-modern-4 in China and KZN in South Africa. This study aimed at investigating the effect the immune dysfunction predictors registered in patients have on the severity of tuberculosis (TB) developing after contracting *M. tuberculosis* Beijing-B0. We compiled a sample of patients with newly diagnosed TB caused by *M. tuberculosis* Beijing-B0, searched for the immune-suppressing diseases/conditions in their medical history and developed their immunograms. No connection was found between the state of the immune system and the characteristics of the disease we considered.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, virulence, drug resistance, compromised immune system, Beijing-B0/W148

Funding: the study is part of the project No. RFMEFI61317X0068 "The role of region-specific polymorphisms of virulence genes in the development of drug resistance by *Mycobacterium tuberculosis*" run by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Kirill V. Shur
Gubkina 3, Moscow, 119333; shurkirill@gmail.com

Received: 02.06.2018 **Accepted:** 14.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.040

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, туберкулез является одной из главных причин смертности населения от бактериальных инфекционных заболеваний. За 2015 г. туберкулезом заболели 10,4 млн человек, в том числе 1 млн детей. До 60% всех новых случаев инфицирования приходится на Индию, Китай, Южную Африку (страны БРИКС), а также Пакистан, Индонезию и Нигерию [1]. Особую опасность представляют штаммы *Mycobacterium tuberculosis*, обладающие лекарственной устойчивостью (МЛУ, ШЛУ), доля которых среди возбудителей заболевания туберкулезом постоянно растет. Особо тревожная ситуация складывается в Индии, Китае и России (на эти страны приходится 45% от всех новых случаев выявления МЛУ-штаммов) [1–3].

В основном для выявления туберкулезной инфекции используют рентгенографический или флюорографический анализ, реже метод магнитно-резонансной томографии. Однако они позволяют выявить заболевание лишь на поздних стадиях. Кроме этих методов диагностики применяют микробиологические (посев на селективные среды с последующей микроскопией) и молекулярные (ПЦР, масс-спектрометрия, ИФА-γ, анализ липоарабиноманнана и другие) [4].

Помимо лекарственной устойчивости эпидемиологически опасной особенностью туберкулезной инфекции является фактор вирулентности [5]. Показано, что представители разных филогенетических линий *M. tuberculosis* обладают различной способностью заражать людей. Так, штаммы самой распространенной и «успешной» линии Beijing имеют повышенную вирулентность, а представители филогенетической линии LAM-KZN, характерной для Южной Африки, с высокой специфичностью поражают людей с иммунодефицитом, вызывая быстро наступающую смерть [6–8].

По предварительным оценкам, на сегодняшний день в РФ до половины изолятов, выделенных у первично обратившихся пациентов, представлены бактериями линии Beijing-B0. Линия характеризуется отсутствием лекарственно чувствительных штаммов и повышенной вирулентностью. Схожая ситуация наблюдается для линий LAM-KZN в ЮАР и Beijing-modern в Китае. Стоит отметить, что все три перечисленные линии очень молоды и возникли в последние 50–60 лет — эру применения антибиотиков [2, 9]. Существует гипотеза, что мутации в генах — мишенях антибиотиков оказывают положительный эффект и на природную лекарственную устойчивость, и на связанную с ней вирулентность [3].

Таким образом, особенно актуальны исследования, выявляющие возможности предупреждения развития эпидемий, вызванных «молодыми» линиями микобактерий туберкулеза, а также повышения эффективности противотуберкулезной терапии за счет обнаружения новых, более приспособленных, линий *M. tuberculosis* путем определения мутаций, ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости и вирулентности [10]. Целью исследования было провести анализ тяжести протекания туберкулезной инфекции у пациентов с различным состоянием иммунной системы при инфицировании *M. tuberculosis* Beijing-B0. Для решения поставленной задачи необходимо было провести сбор и анализ клинических изолятов *M. tuberculosis* с учетом характеристик клинического проявления туберкулезной инфекции, а также определить иммунокомпрометацию пациентов с «опасными» формами туберкулеза. Помимо стандартного набора показателей для пациентов [11] и данных о лекарственной устойчивости

M. tuberculosis, необходимо было учесть и иммунный статус пациента.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и микробиологические среды

В работе использовали коллекцию клинических изолятов *M. tuberculosis*, принадлежащую отделению микробиологии и ПЦР-диагностики Национального медицинского исследовательского центра фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний (Екатеринбург). Культивирование культуры *M. tuberculosis* производили на твердой питательной среде Левенштейна–Йенсена и/или Новая (BioMedia, Россия).

Генотипирование клинических изолятов *M. tuberculosis*

Принадлежность изолятов к генотипу Beijing-B0/W148 определяли согласно рекомендациям [2]. Выделение ДНК проводили с использованием наборов «Проба НК» (ДНК-Технология, Россия) согласно инструкции производителя. Выделенную ДНК использовали для MIRU-VNTR-генотипирования с помощью коммерческого набора реагентов «ТБ-ТЕСТ» (БИОЧИП-ИМБ, Россия) согласно инструкции производителя. Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Наличие ПЦР продукта длиной 1018 п.н. свидетельствовало о принадлежности изолята к генотипу Beijing-B0/W148.

Определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis*

Определение чувствительности к противотуберкулезным препаратам осуществляли методом абсолютных концентраций. Для этого по 0,2 мл суспензии исследуемой культуры, содержащей 10 млн бактериальных клеток, засеивали в пробирки с твердой средой Левенштейна–Йенсена без препаратов (контроль) или с содержанием (по отдельности) противотуберкулезных препаратов в следующих концентрациях: 1 мкг/мл изониазида; 40 мкг/мл рифампицина; 2 мкг/мл этамбутола; 30 мкг/мл канамицина, 30 мкг/мл капреомицина; 1 мкг/мл парааминосалициловой кислоты; 30 мкг/мл циклосерина; 30 мкг/мл протионамида; 2 мкг/мл офлоксацина. Культуру *M. tuberculosis* считали чувствительной, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 колоний. При наличии более 20 колоний изолят считали устойчивым (резистентным) к той концентрации препарата, которая была в среде.

Пациенты — источники клинических изолятов

В работе использовали данные анамнезов и результаты клинических исследований периферической крови пациентов, проходивших лечение в Уральском научно-исследовательском институте фтизиопульмонологии (Екатеринбург). Для проведения исследования было получено разрешение местного этического комитета (протокол №59 от 14.11.2017) и отобраны данные совершеннолетних пациентов с впервые выявленным туберкулезом. Все пациенты были разделены на две группы: в 1-ю группу вошли пациенты с иммунокомпрометацией, во 2-ю группу — пациенты без иммунокомпрометирующих состояний. Критериями включения в 1-ю группу (66 человек) были наличие инфицирования *M. tuberculosis*

Beijing-B0, инфицирование вирусом гепатита В (ВГВ), гепатита С (ВГС), вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), наличие иммунодепрессивного синдрома (ИДС), аллергии, лимфопролиферативных заболеваний, онкологических заболеваний, ревматоидного артрита, сахарного диабета, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ); критерии включения во 2-ю группу (34 человека): наличие инфицирования *M. tuberculosis* Beijing-B0, отсутствие иммунокомпрометирующих состояний. Критерии исключения: несовершеннолетние пациенты, пациенты со вторичным туберкулезом.

Методы статистического анализа

Статистический анализ различий был осуществлен с использованием критерия хи-квадрат (χ^2) с последующей оценкой р-значения ($p < 0.05$). Для расчета значений критерия χ^2 была использована программная среда R (R software v. 3.5.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование коллекции клинических изолятов

Для поиска мутаций в генах вирулентности, потенциально ассоциированных с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*, была составлена выборка клинических изолятов, выделенных от больных туберкулезом пациентов. Для анализа принадлежности изолятов *M. tuberculosis* к филогенетической линии Beijing-B0 было проведено MIRU-VNTR-генотипирование. По результатам анализа профиля было отобрано 100 изолятов *M. tuberculosis*, принадлежащих к генотипу Beijing-B0/W148.

Для каждого исследуемого изолята был также проведен тест на лекарственную чувствительность с использованием метода абсолютных концентраций. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), т. е. устойчивость, по меньшей мере, к рифампицину и изониазиду выявлена у всех 100 изолятов. МЛУ⁺-фенотип (устойчивость к рифампицину, изониазиду и дополнительно устойчивость к фторхинолонам или аминогликозидам/полипептидам) выявлен у 69 изолятов.

Характеристика клинических предикторов иммунных дисфункций

Помимо определения лекарственной чувствительности отобранных изолятов микобактерий туберкулеза был проведен анализ иммунокомпрометации и клинической картины заболевания пациента — источника изолята с

учетом анамнеза пациентов и лабораторных показателей крови. Среди факторов, определяющих обратимость дисфункции иммунной системы, выделяют такие, как голодание или дефицит жизненно важных пищевых компонентов, болезни метаболизма (сахарный диабет, метаболический синдром), психическая депрессия и временный дистресс любой природы. В дополнение к этому, более глубокие нарушения функционирования иммунной системы способны вызывать: инфекции, ионизирующая радиация, химические вещества с лимфотоксическим действием и лимфопролиферативные заболевания [12]. В ходе исследования были изучены предикторы, способные запустить и/или постоянно поддерживать напряжение иммунной системы (табл. 1).

Таким образом, развитие туберкулеза возможно не только вследствие контакта с больным туберкулезом, но и по эндогенному сценарию за счет активации микобактерий туберкулеза (МБТ), находящихся в организме в течение многих лет (латентная инфекция). На основании наличия или отсутствия иммунокомпрометации пациенты были разделены на две группы.

При ко-инфекции (ВИЧ + ТБ) давность заболевания у пациентов зафиксирована в сроки от 1 месяца (когда одновременно с заболеванием туберкулезом пациент узнал о наличии ВИЧ) до 13 лет наблюдения у инфекционистов, предшествовавшего возникновению ТБ (в среднем $37,5 \pm 50,5$ месяца). Уровень вирусной нагрузки был неопределяемым у 3 человек, получавших антиретровирусную терапию (АРВ-терапию). Вирусная нагрузка у лиц, инфицированных ВИЧ, составляла от н/о (не определяется) до 1 млн ($0,22 \pm 0,35$ млн) копий в 1 мл, а количество CD4-лимфоцитов было от 148 до 1060 (611 ± 380) кл./мл ($16,0 \pm 12,3\%$).

Клиническая характеристика туберкулезной инфекции

Известно, что развитие туберкулеза происходит, как правило, в иммунокомпрометированном организме. В нашем исследовании пациентов, имеющих заболевания, оказывающие негативное действие на функцию иммунной системы, насчитывалось в 2 раза больше, чем лиц без них (66 против 34 человек). Несмотря на наличие клинических признаков иммунной недостаточности, проявления туберкулезной инфекции в обеих группах были однотипными (табл. 2).

В обеих группах в большинстве случаев пациенты имели инфильтративную форму туберкулеза. В первой группе несколько реже встречалась диссеминированная форма, но достоверных отличий не зафиксировано ($p > 0,05$). Отмечено, что внелегочные формы регистрировались

Таблица 1. Частота регистрации клинических предикторов иммунных дисфункций у пациентов с иммунокомпрометацией

Нозология	Первая группа (n = 66)	
	n	%
ВГС (вирус гепатита С)	23	34,8
ВГВ (вирус гепатита В)	4	6,1
ВИЧ (вирус иммунодефицита человека)	14	21,2
Другие проявления инфекционного синдрома	51	77,3
ИДС (иммунодепрессивное состояние), аллергический синдром	5	7,5
Лимфопролиферативные заболевания (онкология)	2	3,0
Ревматоидный артрит	1	1,5
Сахарный диабет	10	15,1
ХОБЛ (Хроническая обструктивная болезнь легких)	14	21,2

только у пациентов первой группы, что могло быть отражением степени иммунокомпрометации этих пациентов.

В табл. 3 представлены фазы туберкулезной инфекции у пациентов, включенных в исследование.

Поиск статистически значимых различий между исследуемыми группами был осуществлен с использованием критерия χ^2 . Результаты теста, представленные в табл. 3, свидетельствуют об отсутствии достоверных различий в частоте регистрации фаз специфического воспаления между выделенными группами ($p > 0,05$ для всех групп).

Лабораторные показатели, характеризующие состояние иммунной системы

Наряду с клиническими проявлениями имеются лабораторные признаки иммунных дисфункций (табл. 4). На основании отклонений в показателях можно предположить наличие иммунной недостаточности [13].

В обеих группах характеризующие функцию фагоцитарной системы показатели (количество нейтрофилов и моноцитов)

не различались (табл. 4). При изучении количества лимфоцитов, отражающих состояние клеточного звена иммунитета, достоверных различий не выявлено. Исследуя количество эозинофилов, мы обратили внимание на превышающее среднее значение стандартное отклонение, что означает наличие существенной разнородности внутри группы. Высокая разнородность группы позволяет предположить, что у пациентов первой группы эозинофилия появлялась не только вследствие аллергической реакции на лекарственные препараты, но и как проявление сопутствующей аллергопатологии паразитарной инвазии. В то же время, во второй группе причиной были исключительно аллергические реакции на лекарства, возникающие в любом организме, в том числе без иммунокомпрометации. Уровень СОЭ свидетельствовал об отсутствии различий между группами в отношении гуморального звена иммунитета.

Предположение, высказанное в отношении гуморального звена иммунитета на основании показателя СОЭ (табл. 4), подтвердилось данными о концентрации глобулинов (табл. 5).

Таблица 2. Клинические формы туберкулезной инфекции у пациентов, включенных в исследование

Клиническая форма туберкулеза	Первая группа (n = 66)		Вторая группа (n = 34)		χ^2	p
	n	%	n	%		
Инфильтративная	39	59,1	20	58,8	0,003	0,955
Диссеминированная	5	7,6	3	8,8	0,083	0,773
Туберкулома	14	21,2	6	17,6	0,003	0,955
Фиброзно-кавернозная	5	7,6	5	14,7	0,201	0,654
Внелегочной локализации	3	4,5	0	0	0,361	0,548
Итого:	66	100	34	100		

Таблица 3. Фазы туберкулезной инфекции у пациентов, включенных в исследование

Фаза специфического воспаления	Первая группа (n = 66)		Вторая группа (n = 34)		χ^2	p
	n	%	n	%		
Инфильтрации	58	87,9	30	88,2	0,021	0,885
Распада	41	62,1	25	73,5	0,145	0,704
Обсеменения	29	43,9	15	4,1	0,698	0,403
Стихания (уплотнения, рассасывания, кальцинации)	7	10,6	4	11,7	0,019	0,892

Таблица 4. Показатели периферической крови пациентов, включенных в исследование

Показатели	Первая группа (n = 66)		Вторая группа (n = 34)		95% ДИ	p	
	M	σ	M	σ			
LEU	8,36	3,33	8,22	2,52	-1,134; 1,394	0,839	
СОЭ	25,9	16,1	22,3	14,4	-2,32; 10,32	0,212	
Палочкоядерные нейтрофилы	%	3,6	5,1	2,3	4,2	-0,583; 3,383	0,165
Сегментоядерные нейтрофилы	%	59,6	11,7	56,9	12,1	-2,03; 7,63	0,253
	абс	5102	2588	4785	2076	-663; 1327	0,510
Эозинофилы	%	2,5	2,2	4,4	5,9	-2,787; 0,050	0,736
	абс	206,6	204,1	392,4	678,1	-357; 11,98	0,823
Гранулоциты	%	65,7	13,3	63,6	12,8	-2,993; 7,793	0,380
	абс	5674	2990	5384	2338	-821; 1464	0,579
Лимфоциты	%	25,6	12,5	28,1	12,7	-7,959; 2,359	0,284
	абс	1957	1015	2181	930	-651; 153	0,223
Моноциты	%	8,26	2,9	7,8	2,9	-0,665; 1,465	0,458
	абс	678	360	628	219	-86,07; 174,1	0,504

Примечание: M — среднее значение, σ — стандартное отклонение, ДИ — доверительный интервал.

Таблица 5. Показатели периферической крови пациентов, включенных в исследование

Показатели		Первая группа (n = 66)		Вторая группа (n = 34)		95% ДИ	p
		М	σ	М	σ		
Глюкоза	Ммоль/л	6,1	3,4	5,2	0,6	-0,318; 1,918	0,159
Альбумины	г/л	40,7	6,7	40,1	8,5	-2,584; 3,384	0,791
Глобулины	г/л	32,9	7,8	31,7	8,4	-1,954; 4,554	0,430
Альбумино-глобулиновый индекс	ед.	1,3	0,4	1,3	0,4	-0,146; 0,146	1,000
Общий белок	г/л	74,2	6,6	74,5	5,4	-3,134; 1,934	0,640

Данная фракция отражает количество иммуноглобулинов, определяющих уровень этого показателя. Синтез глобулинов не имел достоверных отличий у пациентов разных групп. Показатели концентрации глюкозы имели некоторые различия внутри первой группы за счет наличия в ней пациентов с сахарным диабетом. В то же время, во второй группе существенных различий внутри группы не зафиксировано, о чем свидетельствует небольшое значение стандартного отклонения. Уровни синтеза альбумина и общего белка не имели различий у пациентов разных групп.

ОБУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для поиска особенностей протекания туберкулеза, вызванного МБТ линии Beijing-B0 нами была сделана выборка пациентов, охарактеризованных по анамнезу, наличию или отсутствию предикторов иммунной дисфункции (ВГВ и ВГС, ВИЧ, ИДС, аллергии, лимфопролиферативные заболевания, онкологические заболевания, ревматоидный артрит, сахарный диабет, ХОБЛ), а также составлена краткая иммунограмма для каждого из пациентов. Формирование такой выборки необходимо для более детального и качественного анализа особенностей протекания туберкулеза, вызванного Beijing-B0 [6], а также позволяет при проведении дальнейших сравнительных геномных исследований выявлять ключевые маркеры (мутации) у изолятов *M. tuberculosis* способствующие успешности данной линии инфицировать иммунокомпрометированных людей. Учетывание многочисленных показателей является критически важным, так как упущение или отсутствие каких-либо данных о пациенте-источнике может привести к недостоверности результатов либо к их бесперспективности [14, 15]. Так, сформированная коллекция из 1000 изолятов *M. tuberculosis*, выделенных в Самаре, не была достаточно подробно охарактеризована, что привело к невозможности продолжения начатой работы [11].

Помимо сбора и писания выборки пациентов — источников клинических изолятов *M. tuberculosis* Beijing-B0 нами был проведен анализ различий характеристик инфекционного процесса и лабораторных показателей между пациентами групп, отличающихся по наличию факторов, влияющих на состояние иммунной системы;

при разных стартовых состояниях иммунной системы клинические формы туберкулезного процесса имеют схожие черты. Нами не было выявлено существенного влияния туберкулеза, вызванного *M. tuberculosis* Beijing-B0, на клиническую картину проявления сопутствующего заболевания, а также связи показателей иммунограммы пациента, кроме тех случаев, когда были обнаружены существенные различия в характере протекания туберкулеза (только при иммунокомпрометации сильной степени, например при числе CD4⁺-лимфоцитов менее 200 кл./мл). На сегодняшний день представлен ряд исследований, демонстрирующих на молекулярном уровне [9, 10, 16], а также на животных моделях особую опасность (патогенность) штаммов данной линии [17, 18]. Возможно, что проведение полногеномного секвенирования, анализа мутаций генов вирулентности и патогенности позволит получить четкий ответ на вопрос об «опасности» данной филогенетической линии *M. tuberculosis* и связи с иммунным состоянием организма человека.

ВЫВОДЫ

Представлена проанализированная по спектру лекарственной устойчивости и пациенту-источнику выборка из 100 клинических изолятов *M. tuberculosis* Beijing-B0. Для каждого образца определены иммунокомпрометирующие состояния и сформирована иммунограмма. Данный подход представляется ключевым для проведения высококачественных геномных исследований, направленных на борьбу с эпидемией, вызванной вирулентным и лекарственно-устойчивым возбудителем туберкулеза.

На сегодняшний день не существует единого формата паспортизации клинических изолятов *M. tuberculosis*, особенно в геномных и филогенетических исследованиях. В работе не только создан паспорт для каждого изолята, но и добавлена информация о пациенте-источнике. Были собраны данные об иммунокомпрометации, состоянии крови пациента (иммунограмма), анамнез пациента. Сформированная коллекция позволит проводить более качественные и всеобъемлющие геномные исследования, а также проводить поиск взаимосвязи между иммунным статусом пациента и генотипом *M. tuberculosis*.

Литература

1. Global tuberculosis report 2017. World Health Organization. 2017: p. 250.
2. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Otten T, Jiao WW, Gomes LL, et al. Russian "successful" clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 3757–9.
3. Naidoo CC, Pillay M. Increased in vitro fitness of multi- and extensively drug-resistant F15/LAM4/KZN strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O361–O369.
4. Leylabadlo HE, Kafil HS, Yousefi M, Aghazadeh M, Asgharzadeh M.

- Pulmonary Tuberculosis Diagnosis: Where We Are? *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016; 79: 134–42.
5. Prozorov AA, Fedorova IA, Bekker OB, Danilenko VN. The virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*: Genetic control, new conceptions. *Russ J Genet*. 2014; 50: 775–97.
 6. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Millet J, Otten T, Vishnevsky B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in Russia: in Search of Informative Variable-Number Tandem-Repeat Loci. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 3576–84.
 7. Shah NS, Auld SC, Brust JCM, Mathema B, Ismail N, Moodley P, et al. Transmission of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in South Africa. *N Engl J Med*. 2017; 376: 243–53.
 8. Ribeiro SCM, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MRM, Almeida FM, Rezende AL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 2615–24.
 9. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One*. 2015; 10: E0143682.
 10. Zaychikova MV, Mikheevcheva NE, Belay YO, Alekseeva MG, Melerzanov AV, Danilenko VN. Single nucleotide polymorphisms of Beijing lineage *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin system genes: Their role in the changes of protein activity and evolution. *Tuberculosis*. 2018; 112: 11–19.
 11. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46: 279–86.
 12. Хайтов Р. М., Игнатъева Г. А., Сидорович И. Г. *Иммунология*. М.: Медицина; 2000. 432 с.
 13. Черешнев В. А., Шмагель К. В. *Иммунология*. М.: Магистр-Пресс; 2013. 448 с.
 14. Kato-Maeda M, Ho C, Passarelli B, Banaei N, Grinsdale J, Flores L, et al. Use of Whole Genome Sequencing to Determine the Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* during an Outbreak. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e58235.
 15. Ibrahim M, Yar AM, Zaman G, Yan C, Khurshid M, Bokhari H. Genome sequence and analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain SWLPK. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 13: 211–3.
 16. Li J, Chai Q-Y, Zhang Y, Li B-X, Wang J, Qiu X-B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Mce3E Suppresses Host Innate Immune Responses by Targeting ERK1/2 Signaling. *J Immunol*. 2015; 94: 3756–67.
 17. Haque MF, Boonhok R, Prammananan T, Chaiprasert A, Utainsincharoen P, Sattabongkot J, et al. Resistance to cellular autophagy by *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *Innate Immun*. 2015; 21: 746–58.
 18. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success. *Tuberculosis*. 2011; 91 (6): 510–23.

References

1. Global tuberculosis report 2017. World Health Organization. 2017: p. 250.
2. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Otten T, Jiao WW, Gomes LL, et al. Russian “successful” clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 3757–9.
3. Naidoo CC, Pillay M. Increased in vitro fitness of multi- and extensively drug-resistant F15/LAM4/KZN strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O361–O369.
4. Leylabadlo HE, Kafil HS, Yousefi M, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. Pulmonary Tuberculosis Diagnosis: Where We Are? *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016; 79: 134–42.
5. Prozorov AA, Fedorova IA, Bekker OB, Danilenko VN. The virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*: Genetic control, new conceptions. *Russ J Genet*. 2014; 50: 775–97.
6. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Millet J, Otten T, Vishnevsky B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in Russia: in Search of Informative Variable-Number Tandem-Repeat Loci. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 3576–84.
7. Shah NS, Auld SC, Brust JCM, Mathema B, Ismail N, Moodley P, et al. Transmission of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in South Africa. *N Engl J Med*. 2017; 376: 243–53.
8. Ribeiro SCM, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MRM, Almeida FM, Rezende AL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 2615–24.
9. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One*. 2015; 10: E0143682.
10. Zaychikova MV, Mikheevcheva NE, Belay YO, Alekseeva MG, Melerzanov AV, Danilenko VN. Single nucleotide polymorphisms of Beijing lineage *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin system genes: Their role in the changes of protein activity and evolution. *Tuberculosis*. 2018; 112: 11–19.
11. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46: 279–86.
12. Хайтов РМ, Игнатъева ГА, Сидорович ИГ. *Иммунология*. М.: Медицина; 2000. 432 с.
13. Черешнев ВА, Шмагель КВ. *Иммунология*. М.: Магистр-Пресс; 2013. 448 с.
14. Kato-Maeda M, Ho C, Passarelli B, Banaei N, Grinsdale J, Flores L, et al. Use of Whole Genome Sequencing to Determine the Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* during an Outbreak. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e58235.
15. Ibrahim M, Yar AM, Zaman G, Yan C, Khurshid M, Bokhari H. Genome sequence and analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain SWLPK. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 13: 211–3.
16. Li J, Chai Q-Y, Zhang Y, Li B-X, Wang J, Qiu X-B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Mce3E Suppresses Host Innate Immune Responses by Targeting ERK1/2 Signaling. *J Immunol*. 2015; 94: 3756–67.
17. Haque MF, Boonhok R, Prammananan T, Chaiprasert A, Utainsincharoen P, Sattabongkot J, et al. Resistance to cellular autophagy by *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *Innate Immun*. 2015; 21: 746–58.
18. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success. *Tuberculosis*. 2011; 91 (6): 510–23.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ ПЛОДОВОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ БЕРЕМЕННОЙ ЖЕНЩИНЫ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НАБОРА ЧАСТОТНЫХ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

Е. Шубина^{1,2}✉, Т. Янкевич², А. Ю. Гольцов^{1,2}, И. С. Мукосей¹, Т. О. Кочеткова¹, А. А. Быстрицкий¹, И. Ю. Барков¹, Н. К. Тетруашвили¹, Л. В. Ким¹, Д. Ю. Трофимов^{1,2}

¹Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва

²ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг (НИПС) анеуплоидий по крови матери применяется для выявления хромосомных анеуплоидий (ХА) с 2011 г. Многочисленные клинические исследования показали, что важным параметром при проведении НИПС является доля плодовой ДНК. Целью работы была разработка тест-системы для оценки доли плодовой ДНК с помощью таргетного секвенирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). По данным исследований международного проекта HAPMAP были отобраны полиморфизмы с высокой частотой встречаемости гетерозиготного генотипа. Для оценки частоты встречаемости отобранных полиморфизмов в российской популяции использовали 827 образцов ДНК доноров. С целью определения доли плодовой ДНК исследовали 87 образцов плазмы крови беременных женщин. Секвенирование проводили на приборах Ion Proton и Ion S5. В ходе работы были определены частоты встречаемости по данным секвенирования пулированных образцов. Проведено сравнение данных о 53 SNP в 87 отдельных образцах. Медиана разницы, полученной различными способами, составила 3,4%. Результаты определения доли плодовой ДНК с помощью SNP сравнивали с данными по Y-хромосоме, корреляция составила 0,7. Таким образом, разработанную тест-систему можно применять для определения доли плодовой ДНК с помощью SNP вне зависимости от пола плода.

Ключевые слова: неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг, доля плодовой ДНК, однонуклеотидные полиморфизмы, хромосомные анеуплоидии

Финансирование: работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.607.21.0136, идентификатор проекта RFMEFI60715X0136).

✉ **Для корреспонденции:** Шубина Екатерина
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; jekaterina.shubina@gmail.com

Статья получена: 15.04.2018 **Статья принята к печати:** 18.04.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.031

QUANTIFICATION OF FETAL DNA IN THE PLASMA OF PREGNANT WOMEN USING NEXT GENERATION SEQUENCING OF FREQUENT SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

Shubina J^{1,2}✉, Jankevic T², Goltsov AY^{1,2}, Mukosey IS¹, Kochetkova TO¹, Bystritsky AA¹, Barkov IY¹, Tetruashvili NK¹, Kim LV¹, Trofimov DY^{1,2}

¹Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

²DNA-Technology LLC, Moscow

Introduced into clinical practice in 2011, non-invasive prenatal testing (NIPT) allows detection of chromosomal aneuploidies in the fetus using maternal blood samples. Multiple studies have shown that one of the key factors affecting the result of this test is the fetal DNA fraction. The aim of this work was to develop a method capable of measuring the fetal DNA fraction based on targeted SNP sequencing. We selected polymorphisms with high frequency of heterozygous genotype from the international HapMap database. To estimate the frequency of these polymorphisms in the Russian population, we used 827 DNA donor samples. Fetal DNA fraction was measured in 87 plasma samples of pregnant women. Sequencing was performed on Ion Proton and Ion S5. We determined the frequencies of the studied polymorphisms in the pooled samples and compared the data on 53 SNPs in the pooled and 87 individual samples. The median difference was 3.4%. The correlation between the results obtained by targeted SNP sequencing and Y chromosome read count was 0.7. Thus, the proposed method can be used to estimate the fetal DNA fraction using SNP genotyping regardless of the fetus's sex.

Keywords: non-invasive prenatal testing, fetal DNA fraction, single nucleotide polymorphisms, chromosome aneuploidy

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement 14.607.21.0136, Project ID RFMEFI60715X0136).

✉ **Correspondence should be addressed:** Jekaterina Shubina
Akademika Oparina 4, Moscow, 117997; jekaterina.shubina@gmail.com

Received: 15.04.2018 **Accepted:** 18.04.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.031

Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг (НИПС) анеуплоидий по крови матери применяется для обнаружения хромосомных анеуплоидий (ХА) с 2011 г. [1]. Многочисленные клинические исследования показали, что важным параметром при проведении НИПС является доля плодовой ДНК [2, 3]. При недостаточном количестве плодовой ДНК снижается чувствительность теста и возможны ложноотрицательные результаты [3].

Долю плодовой ДНК просто определить в случае с беременностью плодом мужского пола. Для этого используют сравнение покрытия Y-хромосомы с покрытием остальных аутосом. Если женщина вынашивает плод женского пола, то оценка представленности плодовых фрагментов становится более сложной задачей.

Известные способы определения представленности плодовой ДНК среди всей свободной циркулирующей ДНК (сцДНК) основаны на выявлении и подсчете фрагментов, для которых можно определить их происхождение. Среди них использование фрагментов, специфичных для Y-хромосомы, которое возможно только для плода мужского пола; не зависящий от пола анализ по-разному метилированных фрагментов сцДНК [4], однонуклеотидных полиморфизмов [5–7], разницы длин фрагментов плодовой и материнской ДНК [8], распределения фрагментов плодовой ДНК по геному [9–11].

С помощью таргетного секвенирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) помимо определения доли плодовой ДНК становится возможной генетическая идентификация образца. Кроме того, этот же подход можно использовать для неинвазивного определения отцовства и пренатальной диагностики [12, 13].

Целью данной работы была разработка тест-системы, позволяющей определять долю плодовой ДНК вне зависимости от пола плода с помощью таргетного секвенирования SNP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор однонуклеотидных полиморфизмов

По данным широкомасштабных популяционных исследований HAPMAP [14] (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) были отобраны 73 полиморфизма с частотой встречаемости гетерозиготного генотипа, равной 49–51% для представителей популяции CEU (люди, произошедшие из западной и северной Европы), и 45–55% для представителей африканской (ASW), китайской (CHD, CHB) и японской популяций (JPT); отобранные полиморфизмы находились на расстоянии не менее 20 млн п.н. на 1–12 хромосомах. Для каждого из отобранных полиморфизмов подобрали специфичные

праймеры для амплификации выбранного фрагмента. Праймеры отбирали таким образом, чтобы длина ПЦР-продукта была не более 110 п.н.

Образцы ДНК и плазмы

Оценку частоты встречаемости полиморфизмов в российской популяции проводили по результатам исследования 827 образцов ДНК, выделенных из крови доноров. Долю плодовой ДНК определяли в 87 образцах плазмы крови беременных женщин (в 45 образцах — у женщин с плодом мужского пола, в 42 — у женщин с плодом женского пола).

Оценка частоты встречаемости полиморфизмов в российской популяции

Поскольку широкомасштабных популяционных данных о частоте встречаемости различных полиморфизмов в российской популяции нет и для отбора полиморфизмов использовали данные, полученные для других популяций, частота встречаемости выбранных полиморфизмов в исследуемой популяции может отличаться от опубликованных данных. В работе проводили оценку частоты встречаемости в российской популяции с помощью таргетного секвенирования смешанных (пулированных) в равных концентрациях образцов ДНК доноров.

Проводили секвенирование 10 пулов из 827 образцов (51–114 образцов/пул). Перед смешиванием ДНК оценивали ее концентрацию с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для оценки частоты встречаемости полиморфизмов в популяции суммировали частоты встречаемости, полученные для каждого пула, с учетом количества образцов в пуле. Результаты оценки частоты встречаемости полиморфизмов, полученные с помощью пулирования, сравнивали с результатами, полученными секвенированием 87 отдельных образцов.

Определение доли плодовой ДНК

Оценку доли плодовой ДНК проводили с помощью секвенирования 53 частотных полиморфизмов, которые были отобраны на основании предварительных данных секвенирования пулированных образцов.

Для определения доли плодовой ДНК использовали полиморфизмы, для которых представленность одного аллеля была более 80%, но менее 99,5%. В этом случае полагали, что мать имеет гомозиготный генотип, а плод гетерозиготный. Долю плодовой ДНК определяли по формуле $ff = 2 \cdot B / (A + B)$, где A — более представленный

Таблица 1. Результаты секвенирования пулированных образцов

Номер пула	Количество образцов	Количество ридов	Количество ридов/полиморфизм med (q1–q3)
1	96	2 681 517	12476 (5195–40260)
2	114	2 002 697	13408 (4724–34127)
3	96	2 711 707	17753 (7810–48959)
4	84	3 037 177	20001 (6742–44910)
5	78	3 884 900	28124 (10032–66108)
6	96	1 677 467	9808 (2860–24624)
7	92	1 592 401	8826 (2503–26345)
8	63	1 759 487	11359 (3629–28146)
9	57	2 340 385	14355 (3983–38147)
10	51	2 403 795	16195 (4686–37680)

аллель, В — менее представленный аллель. В качестве значения доли плодовой ДНК использовали медиану значений для всех информативных полиморфизмов. Значение доли плодовой ДНК, определенные с помощью SNP, сравнивали со значением доли плодовой ДНК, определенным по покрытию Y-хромосомы.

Секвенирование

Библиотеки из ПЦР-продуктов подготавливали согласно рекомендациям производителя (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Секвенирование проводили на приборах Ion Proton и Ion S5 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя.

Анализ данных

Первичный анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Torrent Server 4.4.3. Выравнивание на референсный геном версии GRCh37/hg19 проводили с помощью программного модуля TMAP (Thermo Fisher Scientific Inc., США), после чего для позиций на геноме, соответствующих выбранным полиморфизмам, подсчитывали количество прочтений для каждого из аллелей (разработанный авторами скрипт с использованием программного пакета

rusam [15]), для анализа отбирали фрагменты только с качеством выравнивания не менее 30 и с длиной не менее 80% от ожидаемой длины фрагмента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Секвенирование пулированных образцов

Результаты секвенирования пулированных образцов представлены в табл. 1.

После оценки работы системы в целом и частоты встречаемости отдельных полиморфизмов для дальнейшей работы было отобрано 53 SNP. Исключены полиморфизмы с низкой представленностью. В табл. 2 представлены результаты сравнения частоты встречаемости для 53 SNP по данным секвенирования пулированных образцов и по данным анализа 87 отдельных образцов. Медиана разницы полученной двумя способами частоты встречаемости составила 3,4%.

Результаты определения доли плодовой ДНК

Среднее количество полиморфизмов, для которых у матери был гомозиготный генотип, составило 28 (25–32), из них информативных полиморфизмов было 14 (10–18). На

Таблица 2. Сравнение частот встречаемости SNP по данным секвенирования пулированных образцов и по данным для 87 отдельных образцов

номер SNP	Пулированные образцы (827)		отдельные образцы (87)		номер SNP	Пулированные образцы (827)		отдельные образцы (87)	
	аллель1	аллель2	аллель1	аллель2		аллель1	аллель2	аллель1	аллель2
rs4846002	0,619	0,381	0,592	0,408	rs1265758	0,599	0,4	0,576	0,424
rs4926658	0,577	0,423	0,529	0,471	rs2143829	0,574	0,426	0,616	0,384
rs9434166	0,576	0,424	0,598	0,402	rs591356	0,438	0,562	0,453	0,547
rs10753750	0,564	0,436	0,586	0,414	rs9373116	0,579	0,421	0,494	0,506
rs1973943	0,532	0,467	0,494	0,506	rs7770051	0,479	0,521	0,407	0,593
rs7597744	0,49	0,51	0,494	0,506	rs16	0,516	0,484	0,506	0,494
rs2121304	0,56	0,44	0,558	0,442	rs12333726	0,564	0,435	0,552	0,448
rs1726025	0,517	0,483	0,517	0,483	rs6958027	0,593	0,407	0,523	0,477
rs11164111	0,513	0,487	0,494	0,506	rs314320	0,724	0,276	0,75	0,25
rs981841	0,49	0,509	0,558	0,442	rs625218	0,597	0,403	0,618	0,382
rs1978346	0,653	0,347	0,698	0,302	rs7005848	0,457	0,542	0,5	0,5
rs9843942	0,565	0,435	0,523	0,477	rs952559	0,547	0,453	0,612	0,388
rs6777416	0,587	0,413	0,616	0,384	rs827584	0,72	0,279	0,7	0,3
rs957303	0,61	0,39	0,593	0,407	rs9987271	0,577	0,422	0,541	0,459
rs1553212	0,514	0,486	0,448	0,552	rs6559467	0,583	0,417	0,612	0,388
rs751834	0,561	0,438	0,663	0,337	rs4132699	0,667	0,332	0,647	0,353
rs6771838	0,645	0,354	0,622	0,378	rs10980011	0,599	0,4	0,571	0,429
rs7696439	0,629	0,37	0,663	0,337	rs2583839	0,603	0,397	0,565	0,435
rs4864809	0,452	0,548	0,517	0,483	rs7904536	0,793	0,207	0,941	0,059
rs17002804	0,484	0,516	0,541	0,459	rs4917915	0,531	0,468	0,453	0,547
rs978373	0,497	0,502	0,459	0,541	rs845085	0,681	0,319	0,724	0,276
rs4621390	0,607	0,393	0,57	0,43	rs4333997	0,522	0,477	0,488	0,512
rs7703985	0,491	0,509	0,442	0,558	rs602991	0,696	0,304	0,747	0,253
rs2962799	0,542	0,456	0,541	0,459	rs2289300	0,716	0,283	0,647	0,353
rs902987	0,52	0,478	0,512	0,488	rs7973612	0,704	0,296	0,765	0,235
rs6859147	0,551	0,449	0,547	0,453	rs7971962	0,606	0,39	0,606	0,394
rs4921132	0,495	0,505	0,494	0,506					

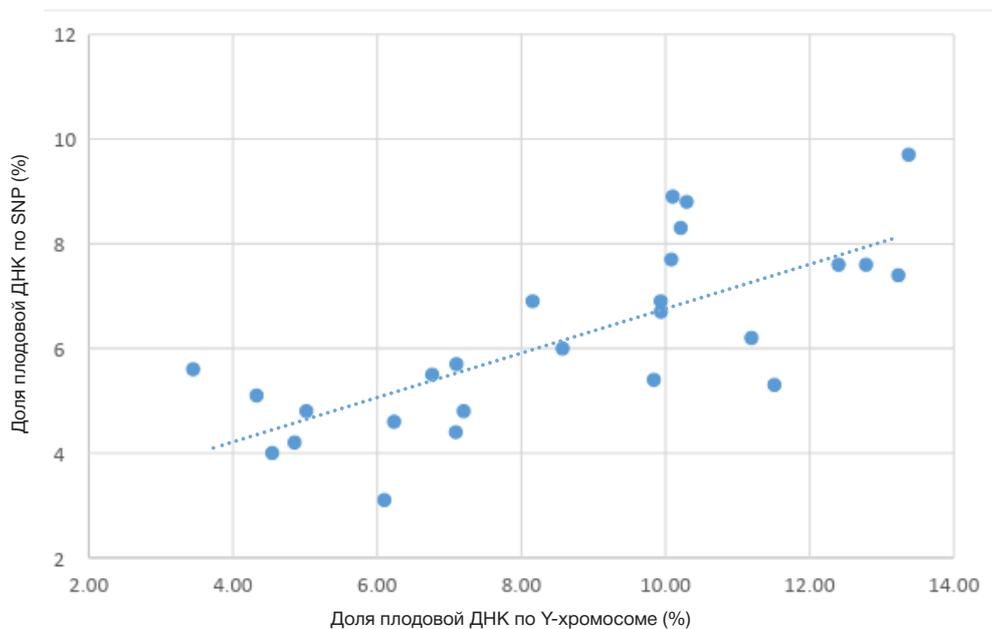


Рис. 1. Сравнение определения доли плодовой ДНК по Y-хромосоме и с помощью таргетного секвенирования частотных полиморфизмов

рис. 1 представлено сравнение результатов определения доли плодовой ДНК с помощью SNP и по данным о покрытии Y-хромосомы, корреляция составила 0,7.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведена оценка встречаемости выбранных полиморфизмов в исследуемой популяции с помощью секвенирования пулированных образцов. Продемонстрировано, что при пулировании и при определении генотипов отдельных образцов получаются сопоставимые результаты. Показана возможность оценки доли плодовой ДНК с помощью таргетного секвенирования небольшого количества частотных полиморфизмов вне зависимости от пола плода. Корреляция результатов определения доли плодовой ДНК с применением таргетного секвенирования и по

Y-хромосоме в нашей работе ниже, чем по упоминающимся в литературе данным об использовании сопоставимого количества полиморфизмов для определения доли плодовой ДНК [7], что можно объяснить использованием в работе этих авторов молекулярных индексов и подсчета отдельных молекул.

ВЫВОДЫ

Предложенный метод можно использовать для оценки частоты встречаемости аллелей в случае частотных полиморфизмов. Помимо определения доли плодовой ДНК, описанный подход может быть применен для идентификации образцов, неинвазивного определения отцовства и неинвазивной диагностики наследственных заболеваний в случае наследования от отца мутации, которой нет у матери.

Литература

1. Agarwal A, Sayres LC, Cho MK, Cook-Deegan R, Chandrasekharan S. Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenat Diagn.* 2013; 33 (6): 521–31.
2. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013; 33 (7): 667–74.
3. Сухих Г. Т., Каретникова Н. А., Баранова Е. Е., Шубина Е. С., Коростин Д. О., Екимов А. Н. и др. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) в группе женщин высокого риска. *Акушерство и гинекология.* 2015; 4: 5–10.
4. Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, Kruse S, Kwong W, van den Boom D, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin Chem.* 2010 Oct; 56 (10): 1627–35.
5. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Apr; 206 (4): 319. e1–9.
6. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn.* 2013 Jun; 33 (6): 575–9.
7. Song Y, et al. Quantitation of fetal DNA fraction in maternal plasma using circulating single molecule amplification and re-sequencing technology (cSMART). *Clin Chim Acta.* 2016; 456: 151–6.
8. Yu SCY, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014 Jun; 111 (23): 8583–8.
9. Kim SK, et al. Determination of Fetal DNA Fraction from the Plasma of Pregnant Women using Sequence Read Counts. *Prenat Diagn.* 2015: n/a–n/a.
10. Straver R, Oudejans CBM, Siermans EA, Reinders MJT. Calculating the fetal fraction for Non Invasive Prenatal Testing based on Genome-wide nucleosome profiles. *Prenat Diagn.* 2016: n/a–n/a.
11. van Beek DM, et al. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples. *Prenat Diagn.* 2017; 37 (8): 769–73.
12. Lv W, et al. Noninvasive prenatal testing for Wilson disease by use of circulating single-molecule amplification and resequencing technology (cSMART). *Clin Chem.* 2015; 61 (1): 172–81.

13. Meng M, et al. Noninvasive prenatal testing for autosomal recessive conditions by maternal plasma sequencing in a case of congenital deafness. *Genet Med.* 2014; 16 (12): 972–6.
14. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003; 426 (6968): 789–96.
15. Li H, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug; 25 (16): 2078–9.

References

1. Agarwal A, Sayres LC, Cho MK, Cook-Deegan R, Chandrasekharan S. Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenat Diagn.* 2013; 33 (6): 521–31.
2. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013; 33 (7): 667–74.
3. Sukhikh GT, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies by next-generation sequencing (NGS) in a group of high-risk women. *Obstetrics and Gynecology.* 2015; 4: 5–10.
4. Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, Kruse S, Kwong W, van den Boom D, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin Chem.* 2010 Oct; 56 (10): 1627–35.
5. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Apr; 206 (4): 319. e1–9.
6. Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn.* 2013 Jun; 33 (6): 575–9.
7. Song Y, et al. Quantitation of fetal DNA fraction in maternal plasma using circulating single molecule amplification and re-sequencing technology (cSMART). *Clin Chim Acta.* 2016; 456: 151–6.
8. Yu SCY, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014 Jun; 111 (23): 8583–8.
9. Kim SK, et al. Determination of Fetal DNA Fraction from the Plasma of Pregnant Women using Sequence Read Counts. *Prenat Diagn.* 2015: n/a–n/a.
10. Straver R, Oudejans CBM, Sistermans EA, Reinders MJT. Calculating the fetal fraction for Non Invasive Prenatal Testing based on Genome-wide nucleosome profiles. *Prenat Diagn.* 2016: n/a–n/a.
11. van Beek DM, et al. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples. *Prenat Diagn.* 2017; 37 (8): 769–73.
12. Lv W, et al. Noninvasive prenatal testing for Wilson disease by use of circulating single-molecule amplification and resequencing technology (cSMART). *Clin Chem.* 2015; 61 (1): 172–81.
13. Meng M, et al. Noninvasive prenatal testing for autosomal recessive conditions by maternal plasma sequencing in a case of congenital deafness. *Genet Med.* 2014; 16 (12): 972–6.
14. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003; 426 (6968): 789–96.
15. Li H, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug; 25 (16): 2078–9.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА *CFTR* У ДЕТЕЙ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

А. И. Никифорова¹✉, Д. Д. Абрамов¹, Г. Ю. Зобкова¹, А. В. Горяинова², С. Ю. Семькин², Е. Шубина³, А. Е. Донников³, Д. Ю. Трофимов^{1,3}

¹ ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

² Российская детская клиническая больница Российского научно-исследовательского университета имени Н. И. Пирогова, Москва

³ Лаборатория молекулярно-генетических методов, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее распространенных моногенных заболеваний человека. Определение частоты мутаций моногенного заболевания для конкретных популяций позволяет оптимизировать ДНК-диагностику, сократив ее себестоимость и время проведения. В статье представлены результаты ретроспективного исследования гена *CFTR* у 191 ребенка со смешанной формой МВ. Для определения 24 наиболее распространенных мутаций *CFTR* использовали диагностическую ПЦР-панель, а минорные варианты выявляли методом высокопроизводительного секвенирования. С помощью диагностической панели в выборке выявлено 18 типичных мутаций гена *CFTR*: F508del (с аллельной частотой 54,7%), dele 2,3 (21kb) (7,3%), 2143delT (3,4%), 2184insA (3,4%), 1677delTA (2,4%), N1303K (2,1%), 3849+10kbC>T (2,1%), E92K (2,1%), G542X (1,6%), W1282X (1,6%), S1196X (1,3%), R334W (1,0%), 394delTT(0,8%), 3944delGT (0,8%), 3821delT (0,5%), 2789+5G>A (0,5%), 621+1G>T(0,3%), 2183AA>G (0,3%). В результате секвенирования обнаружено 24 генетических варианта *CFTR* с потенциальной клинической значимостью. Обнаружено 8 минорных вариантов *CFTR*, до этого не отмеченных у пациентов в РФ, в том числе 4 новых мутации гена *CFTR* — p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs и p.Lys1365Argfs.

Ключевые слова: муковисцидоз, *CFTR*, мутации *CFTR*, российская популяция больных муковисцидозом

Конфликт интересов: исследование проведено при участии сотрудников компании ДНК-Технология.

✉ **Для корреспонденции:** Никифорова Алёна Игоревна
Каширское ш., д. 24, г. Москва, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Статья получена: 10.07.2018 **Статья принята к печати:** 03.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.037

DETECTION OF *CFTR* MUTATIONS IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS

Nikiforova AI¹✉, Abramov DD¹, Zobkova GYu¹, Goriainova AV², Semykin SYu², Shubina J³, Donnikov AE³, Trofimov DYu^{1,3}

¹ DNA-Technology LLC, Moscow

² Russian Children's Clinical Hospital, Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow

³ Laboratory of Molecular Genetics, Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common monogenic disorders of humans. The knowledge of population frequency of a mutant genotype causing a monogenic disease helps to optimize DNA testing and to reduce its costs and time required for the procedure. This article presents the results of a retrospective study of the *CFTR* gene in 191 children with mixed manifestations of CF. To screen for 24 most common mutations, we used the diagnostic PCR panel; minor mutations were detected by next generation sequencing. The diagnostic panel allowed us to identify 18 typical *CFTR* mutations, including F508del (allelic frequency of 54.7%), dele 2,3 (21kb) (7.3%), 2143delT (3.4%), 2184insA (3.4%), 1677delTA (2.4%), N1303K (2.1%), 3849+10kbC>T (2.1%), E92K (2.1%), G542X (1.6%), W1282X (1.6%), S1196X (1.3%), R334W (1.0%), 394delTT(0.8%), 3944delGT (0.8%), 3821delT (0.5%), 2789+5G>A (0.5%), 621+1G>T(0.3%), and 2183AA>G (0.3%). Sequencing revealed the presence of 24 potentially pathogenic *CFTR* variants in the sample. We also discovered 8 minor *CFTR* variants previously unseen in Russian patients with CF, including 4 new *CFTR* mutations: p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs, and p.Lys1365Argfs.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR*, *CFTR* mutations, Russian population

Conflict of interests: the study was conducted in collaboration with DNA-Technology staff.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alena I. Nikiforova
Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Received: 10.07.2018 **Accepted:** 03.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.037

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз, — наследственное заболевание, характеризующееся системным поражением экзокринных желез организма, проявляющееся тяжелыми нарушениями функций органов дыхания и пищеварительного тракта. МВ наследуется по аутосомно-рецессивному типу и обусловлен патогенными мутациями в гене трансмембранного регулятора муковисцидоза (*CFTR*) [1]. Наиболее частая причина возникновения МВ — мутация F508del (rs113993960),

приводящая к делеции фенилаланина в 508 положении [1–3]. В настоящее время МВ неизлечим и требует проведения комплексных терапевтических мер на протяжении всей жизни пациента.

МВ входит в число наиболее частых наследственных заболеваний. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в среднем в мире МВ встречается с частотой 1:2500–3000 новорожденных [3]. В национальном

регистре за 2015 г. в Российской Федерации официально зарегистрировано 2916 больных муковисцидозом [4]. В 2016 г. частота встречаемости МВ у новорожденных РФ составила 1:8788 [5].

Крайне важно диагностировать МВ еще на доклиническом этапе заболевания — своевременно начатое лечение существенно снижает риск развития необратимых изменений органов дыхательной системы и ЖКТ ребенка, что, несомненно, отражается на качестве жизни самого больного и его близких [6].

Инструментом ранней диагностики МВ служит неонатальный скрининг (проводится в РФ с 2006 г.). В РФ он включает комплекс диагностических исследований, выполняемых последовательно: тест на содержание иммунореактивного трипсина (ИРТ) в крови, повторный тест на ИРТ, потовый тест на содержание ионов хлора (назначается при превышении пороговых значений ИРТ) [7].

Молекулярно-генетическая диагностика, или ДНК-диагностика (определение мутаций в гене *CFTR*), при МВ проводится в несколько этапов. В первую очередь, осуществляется поиск частых мутаций с использованием специфических диагностических панелей [3, 7, 8]. Если частые мутации *CFTR* идентифицированы не были, проводят секвенирование гена [3, 9], затем при необходимости специальными методами осуществляется поиск крупных структурных вариаций гена *CFTR* [3].

В настоящее время ДНК-диагностика МВ не является строго обязательной, чаще выполняется при получении неоднозначного результата исследования или невозможности проведения потовой пробы. Тем не менее характер мутаций является одним из факторов, предопределяющих тяжесть течения заболевания [3], а подтверждение генотипа позволяет рекомендовать пациентам прицельную фармакогенетическую терапию [2, 3]. Одно из преимуществ ДНК-диагностики состоит в точности метода (в отличие от потовой пробы, результат исследования последовательности гена не зависит от физиологических особенностей пациента).

На сегодняшний день в РФ можно констатировать недостаточную доступность генетической диагностики муковисцидоза. Однако за последние годы был накоплен существенный объем данных по генетической эпидемиологии МВ в России. Определены наиболее распространенные варианты мутаций гена *CFTR* [3, 8], установлены особенности генетики МВ у различных этнических групп, а также описаны межрегиональные различия частот встречаемости патогенных аллелей [8, 10, 11] (например, мутация E92K (rs121908751), которая наиболее часто встречается среди представителей популяции Чувашии). С 2011 г. В национальном регистре больных МВ ведется учет данных о мутациях гена *CFTR* [12]. На платформе открытой международной базы данных генетических вариантов LOVD v.3.0 (Leiden Open Variation Database) создан и дополняется реестр аллельных вариантов гена *CFTR*, представленных у жителей РФ, под названием «SeqDB-LOVD»/«Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов» [13]. В «SeqDB-LOVD» представлена информация по клинической значимости различных вариантов гена, в том числе популяционно редких. Последнее стало возможным за счет активного внедрения в исследовательскую практику технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS).

Согласно данным «SeqDB-LOVD» на текущий момент в РФ зарегистрировано более 220 клинически значимых мутаций гена *CFTR*, при этом новые неописанные

аллельные варианты регистрируются в сравнительно малочисленных выборках [9]. Учитывая данное наблюдение, можно предполагать, что действительное разнообразие патогенных мутаций *CFTR* существенно выше.

В отделении педиатрии Российской детской клинической больницы имени Н. И. Пирогова ежегодно проходят наблюдение около 500 детей из разных регионов РФ, в том числе до 100 пациентов с диагнозом МВ. С 2014 по 2017 г. в отделение поступило более 200 детей с клинической картиной МВ, в большинстве случаев с неполными данными генотипирования (молекулярно-генетическая диагностика не была проведена, либо у пациента была известна мутация в одном из аллелей гена *CFTR*). Целью настоящей работы стало определение спектра патогенных вариантов гена *CFTR* в выборке из 191 пациента со смешанной формой МВ и тяжелым течением.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для проведения ретроспективного исследования отобраны образцы крови 191 ребенка с диагнозом муковисцидоз, с тяжелым или среднетяжелым течением заболевания, проходивших лечение в Российской детской клинической больнице РНИМУ им. Н. И. Пирогова в период с 2014 г. по начало 2017 г. В большинстве случаев пациенты не имели подтвержденного генетического диагноза. В исследованную группу вошли дети обоих полов из 57 субъектов РФ (Московская область и Ставропольский край были представлены в выборке 15 пациентами, другие регионы РФ — 1–9 пациентами). Критерии включения: клинически установленный диагноз муковисцидоз смешанная форма, тяжелое течение (Е 84.8). Критерии исключения: клинически установленный диагноз муковисцидоз, преимущественно легочная форма (Е 84.0) и пациенты с легкими или пограничными клиническими проявлениями кистозного фиброза. Основную часть выборки составили неродственные пациенты, в 4 случаях исследованы пары сибсов. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (протокол № 172 от 19.02.18).

Забор биоматериала пациентов (периферическая кровь) проводили на базе детской клинической больницы им. Н. И. Пирогова. Геномную ДНК пациентов выделяли из образцов цельной крови, архивированной в Биобанке Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова, с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ДНК-Технология, Россия) согласно инструкции производителя.

Для определения наиболее распространенных мутаций в гене *CFTR* использовали комплекты реагентов «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз Скрин» и «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз — редкие мутации» (ДНК-Технология, Россия). Комплекты реагентов разработаны для определения 8 (F508del, dele 2,3 (21kb), 2143delT, 1677delTA, N1303K, 3849+10kbC>T, E92K, W1282X) и 16 (2184insA G542X, S1196X, R334W, 394delTT, 3944delGT, 3821delT, 2789+5G>A, 621+1G>T, 2183AA>G, L138ins, R117H, 604insA, 3667insTCAA, R553X, K598ins) вариантов мутаций в гене *CFTR* соответственно (здесь и далее приведены тривиальные названия мутаций, определяемых в составе панелей). Принцип работы наборов основан на методе «примыкающих проб» (kissing probes) [14] и включает: ПЦР-амплификацию целевого участка гена, гибридизацию последовательности специфических

зондов с продуктами амплификации и регистрацию кривых плавления зондов в ходе температурной денатурации (рис. 1) [15, 16]. ПЦР и определение температуры плавления зондов проводили при помощи детектирующего амплификатора DTrime (ДНК-Технология, Россия).

Поиск редких и новых вариантов *CFTR* проводили методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Ion Torrent™ (Thermo Fisher Scientific, США). Целевые участки включали в себя кодирующие области (27 экзонов гена *CFTR*), интрон-экзонные границы и область промотера гена. Дополнительно в панель включен фрагмент для идентификации интронного варианта 3849+10kbC>T (rs75039782) патогенного значения. Для определения распространенной у представителей российской популяции делеции 2–3 экзонов *CFTR* — *dele* 2,3 (21 kb) в панель мишеней были добавлены области, охватывающие ее границы (табл. 1).

Обогащение целевых фрагментов перед секвенированием проводили методом ПЦР. В ПЦР брали не менее 10 нг геномной ДНК. Лигирование адаптеров к ПЦР-продуктам проводили с использованием T4 ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Качество библиотек фрагментов ДНК определяли с помощью системы Agilent 2100 Bioanalyzer и набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США). Для постановки высокопроизводительного секвенирования использовали платформу Ion PGM Next-Generation Sequencing

Systems (Ion Torrent™, США), набор Ion PGM™ Template OT2 400 Kit (Ion Torrent™, США). Высокопроизводительное секвенирование выполняли на базе лаборатории молекулярно-генетических методов Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова.

Первичный анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Torrent server 4.4.3. Выравнивание на референсный геном версии GRCh37/hg19 выполняли с помощью программного модуля TMAP (в референсный геном был внесен фрагмент, соответствующий «fusion-ампليкону», маркирующему наличие делеции *CFTRdele* 2,3 (21 kb), для идентификации генетических вариантов был использован программный модуль Torrent Variant Caller 5.4.0.46. Последующий анализ проводили с помощью программных модулей, разработанных авторами. Медиана покрытия целевых участков составила 4500 прочтений, минимальное покрытие — 500. Для определения патогенности использовали базу данных dbSNP Build 147, локус-специфичные базы данных «*CFTR1*» [17], «*CFTR2*» [18], «SeqDB-LOVD» [13], а также данные литературы. Подтверждение генетических вариантов проводили методом секвенирования ДНК по Сэнгеру (по обеим цепям) на секвенаторе ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с оригинальными реагентами, согласно рекомендациям производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

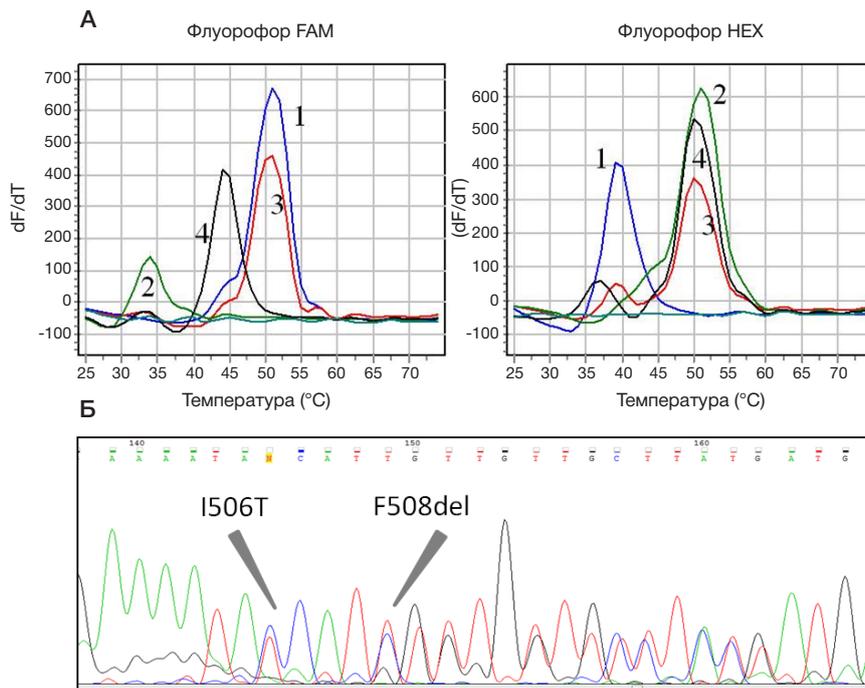


Рис. 1. А. Кривые плавления для разных вариантов генотипа, регистрируемые при определении мутации F508del (rs113993960) и пример сочетания в генотипе вариантов F508del и I506T (rs397508224). Канал FAM/HEX — регистрация плавления зондов комплементарных последовательности гена без мутации и при ее наличии соответственно. Динамика плавления зондов регистрируется в диапазоне от 25 до 75 °C и имеет отличительные особенности в различных вариантах генотипа. 1 — отсутствие мутации в генотипе; 2 — гомозигота по мутации; 3 — гетерозигота по мутации; 4 — случай сочетания в генотипе мутаций F508del и I506T (положение максимума кривых плавления не соответствует стандартным вариантам). Б. Сиквенсная хроматограмма фрагмента последовательности ДНК с сочетанием F508del и I506T

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации участков, включающих области границ делеции *CFTRdele* 2,3 (21 kb)

Праймер	Последовательность
del2,3F1	tcc ctt ggt aaa att aag cct cat g
del2,3R1	ccc tcc tct gat tcc aca agg tat
del2,3F2	ccc aaa aac tat tgt cag act ctg ct
del2,3R2	cac cta cac tca gaa ccc atc ata gg

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате ПЦР-генотипирования в выборке было выявлено 18 мутаций гена *CFTR* (табл. 2). В гомозиготном состоянии определены следующие мутации: F508del — 70 случаев; E92K, 1677delTA и dele 2,3 (21kb) — в 3 случаях каждая, W1282X — 1 случай. У 144 пациентов (75,4%) удалось определить две патогенные мутации *CFTR*, у 41 пациента — 1 мутацию (21,5%), не было выявлено мутаций у 6 пациентов (3,1%). У 112 пациентов (58,6%) две патогенные мутации были выявлены с помощью панели для определения 8 наиболее частых мутаций *CFTR* (см. Пациенты и методы).

В 99% случаев по каждой мутации панели был получен однозначный результат типирования. В двух образцах (1% случаев) при определении одного из вариантов кривые плавления не соответствовали стандартным. В результате секвенирования прямым методом в данных образцах на участках гибридизации аллель-специфичных зондов были выявлены нецелевые однонуклеотидные замены (SNP) (рис. 1). В 47 случаях, для которых патогенные мутации не были определены ПЦР-методом, было проведено исследование гена *CFTR* методом NGS. В итоге секвенирования у пациентов суммарно выявлено более 300 генетических вариантов, 24 из которых имеют потенциальное клиническое значение (учтены варианты, описанные в локус-специфичных базах данных как патогенные, либо нонсенс, либо варианты сдвига рамки считывания (табл. 2). Несколько вариантов отмечено более одного раза, наиболее часто (у 5 неродственных пациентов) зарегистрирована патогенная мутация p.Ser466Ter (rs121908805) в составе сложного аллеля (табл. 3).

Были выявлены четыре ранее не описанные мутации *CFTR*: с.4093delA/p.Lys1365Argfs и с.4078delG/p.Val1360Phefs (мутации сдвига рамки считывания), с.1132C>T/p.Gln378Ter и с.2455G>T/p.Glu819Ter (нонсенс-мутации) патогенного значения (табл. 4). Новые варианты выявлены в гетерозиготном состоянии в сочетании с одной из частых мутаций гена (табл. 3). Данные варианты *CFTR* зарегистрированы нами в аллель-специфичной базе данных платформы LOVD.

В двух образцах при верификации результатов высокопроизводительного секвенирования методом Сэнгера в экзоне 24 выявлена делеция, приводящая к сдвигу рамки считывания p.Ile1214Phefs (rs397508630).

В результате проведения расширенной ДНК-диагностики две и одна патогенные мутации определены у 178 пациентов и у 13 пациентов соответственно. Отметим, что наиболее часто встречающаяся в РФ мутация F508del (rs113993960) была выявлена у 139 пациентов из 49 регионов РФ. У четырех неродственных пациентов из Ингушетии и Чечни выявлена мутация 1677delTA (rs121908776). У трех из четырех пациентов из Чувашии в гомозиготном состоянии выявлена мутация E92K.

Доля пациентов с двумя «тяжелыми» мутациями *CFTR* (I–III классы *CFTR* [19]) составила 69,6%. Доля пациентов с одной или двумя «мягкими» мутациями (IV–V классы *CFTR* [19]) составила 8,4%, с одной или двумя мутациями «неопределенной клинической тяжести» — 22%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследованной группе пациентов выявлено 36 различных патогенных мутаций гена *CFTR*, большинство из них относится к распространенным в РФ вариантам [4, 8]. F508del (rs113993960) — наиболее частый вариант в выборке как в целом, так и в группах пациентов из регионов с преобладанием русского населения. Частоты остальных мутаций выборки соответствуют данным по российской популяции больных муковисцидозом [4, 8]. 10 наиболее частых мутаций выборки соответствует списку национально регистра [4]. Было отмечено преобладание мутации 1677delTA (rs121908776) у группы детей из регионов Северного Кавказа. У детей из Чувашии зарегистрирована характерная этническая мутация E92K (rs121908751). На основании полученных результатов исследованная группа детей может быть рассмотрена как репрезентативная выборка жителей РФ, больных МВ, результаты генотипирования которой позволяют пополнить информацию о генетическом разнообразии МВ в России.

Таблица 2. Результаты ПЦР-генотипирования у 191 пациента с диагнозом муковисцидоз

Мутация	RefSNP (rs)	Аллельная частота (%)
F508del	rs113993960	54,7
dele 2,3 (21kb)	–	7,3
2143delT	rs121908812	3,4
2184insA	rs121908786	3,4
1677delTA	rs121908776	2,4
N1303K	rs80034486	2,1
3849+10kb C>T	rs75039782	2,1
E92K	rs121908751	2,1
G542X	rs113993959	1,6
W1282X	rs77010898	1,6
S1196X	rs121908763	1,3
R334W	rs121909011	1,0
394delTT	rs121908769	0,8
3944delGT	rs397508612	0,8
3821delT	rs77035409	0,5
2789+5G>A	rs80224560	0,5
621+1G>T	rs78756941	0,3
2183AA>G	rs121908799	0,3

Таблица 3. Результаты высокопроизводительного секвенирования гена *CFTR* у 47 пациентов

п/н	Данные ПЦР	Данные секвенирования
1	dele 2,3 (21kb)/?	dele 2,3 (21kb)/p.Asn415Terfs (rs397508184)
2	3849+10kbC>T/?	3849+10kbC>T/Tyr84Ter (rs-)
3	F508del/?	F508del/p.Ile1214Phefs (rs397508630) *
4	F508del/?	F508del/p.Arg1070Gln (rs78769542)
5	?/?	[p.Ser466Ter; p. Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)/?
6	?/?	p.Arg1066Cys(rs78194216)/ p.Arg1066Cys (rs78194216)
7	1677delTA/? (E92K)	1677delTA/p.Ala96Glu (rs397508449)
8	?/?	c.1766+1G>C (rs121908748)/p.Gly314Arg (rs397508819)
9	?/?	c.580-1G>T (rs121908748)/c.1766+2T>C (rs-)
10	? (F508del)/?	F508del/p.Ile506Thr (rs397508224)
11	?/?	p.Gln39Ter (rs397508168)/p.Arg785Ter (rs374946172)
12	F508del/?	F508del/?
13	N1303K/?	N1303K/p.Asn415Terfs (rs397508184)
14	F508del/?	F508del/?
15	F508del/?	F508del/p.Arg347Pro (rs77932196)
16	F508del/?	F508del/p.Leu15Phefs (rs397508715)
17	3944delGT/?	3944delGT/p.Phe1286Ser (rs121909028)
18	S1196X/?	S1196X/p.Leu15Phefs (rs397508715)
19	F508del/?	F508del/p.Glu1418Argfs (rs397508706)
20	F508del/?	F508del/p.Arg1066Cys (rs78194216)
21	F508del/?	F508del/p.Glu819Ter (rs-)*
22	F508del/?	F508del/c.3140-16T>A (rs767232138)
23	F508del/?	F508del/?
24	F508del/?	F508del/p.Trp1282Arg (rs397508616)
25	F508del/?	F508del/p.Gln378Ter (rs-)*
26	dele 2,3 (21kb) /?	dele 2,3 (21kb)/p.Glu217Gly, p.Arg153Lys (rs121909046, rs149197463)
27	W1282X/?	W1282X/p.Gly1047Ser (rs397508504)
28	S1196X/?	S1196X/p.Leu15Phefs (rs397508715)
29	2143delT/?	2143delT/ [p.Ser466Ter; p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
30	dele 2,3 (21kb) /?	dele 2,3 (21kb)/p.Val1360Phefs (rs-)*
31	F508del/?	F508del/p.Trp1282Arg (rs397508616)
32	F508del/?	F508del/p.Trp496Ter (rs200626971)
33	3944delGT/?	3944delGT/?
34	N1303K/?	N1303K/p.Lys1177Serfs (rs121908747)
35	F508del/?	F508del/?
36	G542X/?	G542X/p.Ser466Ter;p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
37	F508del/?	F508del/p.Lys1365Argfs (rs-)*
38	dele 2,3 (21kb) /?	dele 2,3 (21kb)/p.Ile1214Phefs (rs397508630) **
39	2143delT/?	2143delT/[p.Ser466Ter; p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
40	dele 2,3 (21kb)	dele 2,3 (21kb)/p.Arg785Ter (rs374946172)
41	F508del/?	F508del/?
42	W1282X/?	W1282X/?
43	394delTT/?	394delTT/p.Trp1282Arg (rs397508616)
44	3849+10kbC>T/?	3849+10kbC>T/[p.Ser466Ter; p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
45	2183AA>G/?	2183AA>G/?
46	F508del/?	F508del/p.Trp1310Ter (rs397508645)
47	F508del/?	F508del/p.Trp1063Terfs (rs-)

Примечание: * — полужирным начертанием выделены 4 ранее неописанные мутации *CFTR*; ** — вариант p.Ile1214Phefs (rs397508630), определенный методом секвенирования по Сэнгеру; ? — кандидатные варианты не установлены.

Таблица 4. Описание четырех новых вариантов *CFTR* и фенотипов пациентов

Идентификатор пациента	Пол	Фенотип	Описание нового варианта
BRMVedZB99	Ж	Муковисцидоз, смешанная форма, тяжелое течение. Хронический гнойный обструктивный бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность. Бронхоэктазы. Цирроз печени	NC_000007.14:g.117592622G>T; NM_000492.3:c.2455G>T; NP_000483.3:p.Glu819Ter
BRMVedZB112	Ж	Муковисцидоз смешанная форма, тяжелое течение. Хроническая панкреатическая недостаточность. Бронхоэктазы	NC_000007.14:g.117542031C>T; NM_000492.3:c.1132C>T; NP_000483.3:p.Gln378Ter
BRMVedZB138	М	Муковисцидоз, смешанная форма, тяжелое течение. Хронический гнойный обструктивный бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность. Хронический полипозный риносинусит	NC_000007.14:g.117664802delG; NM_000492.3:c.4078delG; NP_000483.3:p.Val1360Phefs 20
BRMVedZB185	М	Муковисцидоз, смешанная форма, тяжелое течение. Хронический гнойный бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность. Цирроз печени. Хронический полипозный риносинусит	NC_000007.14:g.117664818delA; NM_000492.3:c.4094delA; NP_000483.3:p.Lys1365Argfs15

Методами секвенирования выявлено 24 клинически значимых варианта *CFTR* (22 из которых минорные), из них 8 ранее не отмечены у пациентов российского регистра: p.Gln39Ter (rs397508168), p.Phe1286Ser (rs121909028), p.Ile1214Phefs (rs397508630), p.Trp1063Terfs, p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs и p.Lys1365Argfs. Обнаруженные мутации согласно предсказательным программам *in silico* обуславливают образование укороченного белка MBTP и являются патогенными (класс мутаций I).

Эффективность выявления патогенных аллелей *CFTR* методом ПЦР для исследованной выборки составила 86,1% (при этом 1 или 2 патогенных мутации было выявлено в 96,9% случаев), показатель удовлетворяет требованиям, предъявляемым к эффективности диагностических панелей [19]. Однако принимая во внимание данные по генетической эпидемиологии MB последних лет [4, 13], а также результаты расширенной диагностики исследованной выборки, диагностическая эффективность панели может быть повышена за счет включения вариантов p.Ser466Ter (rs121908805), p.Trp1282Arg (rs397508616) и p.Leu15Phefs (rs397508715). Технологическое решение, используемое для определения известных мутаций гена *CFTR* на основе метода ПЦР с «примыкающими зондами», при сравнении с альтернативными подходами (MLPA, RFLP) демонстрирует ряд преимуществ: все этапы исследования, включая анализ графиков кривых плавления, выполняются в одном приборе, не требуется постановка электрофореза. Программное обеспечение автоматически осуществляет трактовку полученных результатов. В то же время возможен визуальный контроль результатов по графикам кривых плавления, что позволяет регистрировать наличие полиморфизмов, расположенных близко к целевой мутации. Учитывая относительную простоту, возможности для оптимизации (сокращение набора пробирок с индивидуальными тестами при реализации варианта мультиплексной ПЦР) и автоматизации процесса, в технологии заключен потенциал высокопропускного метода ДНК-диагностики/скрининга частых наследственных заболеваний.

Эффективность расширенной ДНК-диагностики с применением методов секвенирования составила 95,4% (во всех случаях была выявлена хотя бы одна мутация патогенного значения). Причины невыявления мутаций могут быть связаны с ограничениями технологии NGS, кроме того, для повышения эффективности диагностики обычно требуется доработка панели, а также оптимизация

алгоритмов анализа [20]. В частности, технология Ion Torrent не позволяет достоверно распознавать мутации внутри гомополимерных участков, например не могут быть установлены мутации *CFTR* по типу 2184insA (rs121908786). В нашей работе делеция аденина внутри участка ТАТТТ[А/–] ТТТТТСТ (мутация p.Ile1214Phefs (rs397508630)) была установлена после секвенирования данного фрагмента по Сэнгеру. Существенной проблемой для технологии являются также протяженные делеции и дупликации, распознавание гетерозиготного носительства которых требует применения специальных биоинформатических алгоритмов обчета данных, а в случае крупных делеций — введения в панель дополнительных мишеней, захватывающих границы делеций [9], либо серий дополнительных мишеней, учитывающих популяционно частые варианты гена. На данный момент у больных MB жителей РФ выявлено несколько вариантов крупных делеций, из которых наиболее распространенная *CFTR*dele 2,3 встречается с частотой 1,4–8% [8]. Достоверное определение гетерозиготного носительства делеции *CFTR*dele 2,3 с помощью метода NGS в нашем исследовании было возможно при добавлении дополнительных пар праймеров на границы делеции, в то время как оценка представленности прочтений при сравнении результатов секвенирования гомо-, гетерозигот и нормы по *CFTR*dele 2,3 оказалась ненадежным решением.

ВЫВОДЫ

По данным национального регистра больных MB 30–35 мутаций *CFTR* представлены у пациентов с аллельной частотой не более 1%, в то же время, в сумме распространенные патогенные варианты составляют около 20% от всего аллельного разнообразия. Эффективная молекулярно-генетическая диагностика MB на практике может быть обеспечена при условии сочетания различных технологических подходов, например определения отдельных полиморфизмов методом ПЦР с последующим NGS негативных образцов. В настоящем исследовании 86,1% патогенных аллелей *CFTR* было выявлено с использованием панели для определения 24 генетических вариантов, ассоциированных с MB, 10% идентифицировано методами секвенирования. Выявлено 8 минорных вариантов *CFTR*, до этого не отмеченных у жителей РФ, включая 4 новых патогенных мутации — p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs и p.Lys1365Argfs.

Литература

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989 Sep 8; 245 (4922): 1073–80.
2. Dodge JA. A millennial view of cystic fibrosis. *Dev Period Med*. 2015 Jan-Mar; 19 (1): 9–13.
3. Баранов А. А., Капранов Н. И., Каширская Н. Ю. и др. Проблемы диагностики муковисцидоза и пути их решения в России. *Педиатрическая фармакология*. 2014; 11 (6): 16–23.
4. Кондратьева Е. И., Красовский С. А., Воронкова А. Ю., Амелина Е. Л., Черняк А. В., Каширская Н. Ю., редакторы. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2015 год. М.: ИД МЕДПРАКТИКА-М; 2016. 72 с.
5. Шерман В. Д., Кондратьева Е. И., Каширская Н. Ю., Калиненкова С. Г., Коталевская Ю. Ю. Неонатальный скрининг на муковисцидоз. Итоги 10 лет. Вторая Всероссийская научно-практическая конференция «Новые технологии диагностики наследственных болезней» Москва, 27–28 октября 2017 г.
6. Каширская Н. Ю., Красовский С. А., Черняк А. В. и др. Динамика продолжительности жизни больных муковисцидозом, проживающих в Москве, и ее связь с получаемой терапией: ретроспективный анализ за 1993–2013 гг. *Вопросы современной педиатрии*. 2015; 14 (4): 503–8.
7. Шерман В. Д., Каширская Н. Ю., Капранов Н. И. Современный алгоритм диагностики муковисцидоза. *Педиатрия*. 2014; 93 (4).
8. Степанова А. А., Красовский С. А., Поляков А. В. Информативность поиска 19 частых мутаций в гене CFTR у российских больных муковисцидозом и расчетная частота заболевания в Российской популяции. *Генетика*. 2015; 52 (2): 231–41.
9. Симакова Т. С., Брагин А. Г., Глушкова М. А., Петрова Н. В., Поляков А. В., Кондратьева Е. И., и др. Опыт применения таргетного секвенирования для молекулярной диагностики муковисцидоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (5): 305–9.
10. Степанова А. А., Аbruкова А. В., Саваскина Е. Н., Поляков А. В. Мутация p.E92K – основная причина муковисцидоза у чувашей. *Генетика*. 2012; 48 (7): 863–71.
11. Петрова Н. В., Тимковская Е. Е., Васильева Т. А. и др. Особенности спектра мутаций в гене CFTR у больных муковисцидозом из Карачаево-Черкессии. *Медицинская генетика*. 2015; 14 (7): 32–6.
12. Красовский С. А., Черняк А. В., Каширская Н. Ю. и др. Муковисцидоз в России: создание национального регистра. *Педиатрия*. 2014; 93 (4).
13. Доступно по ссылке: <http://seqdb.med-gen.ru/>
14. Кofiади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика* 2006; 42 (1): 22–32.
15. Абрамов Д. Д., Кадочникова В. В., Якимова Е. Г., Белоусова М. В., Маерле А. В., Сергеев И. В. и др. Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена CFTR, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена PAH, ассоциированных с фенилкетонурией. *Вестн. РГМУ*. 2015; (4): 32–5.
16. Сергеев И. В., Хайтов М. Р., Трофимов Д. Ю., Абрамов Д. Д., Грудакова Е. Г., Гончарова Е. В. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. *Физиол. и патол. иммун. системы*. 2009; 13 (4): 21–6.
17. Доступно по ссылке: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
18. Доступно по ссылке: <https://www.cftr2.org/>
19. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008 May; 7 (3): 179–96.
20. Shin S, Kim Y, Chul Oh S, Yu N, Lee ST, Rak Choi J, et al. Validation and optimization of the Ion Torrent S5 XL sequencer and OncoPrint workflow for BRCA1 and BRCA2 genetic testing. *Oncotarget*. 2017 May 23; 8 (21): 34858–66.

References

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989 Sep 8; 245 (4922): 1073–80.
2. Dodge JA. A millennial view of cystic fibrosis. *Dev Period Med*. 2015 Jan-Mar; 19 (1): 9–13.
3. Baranov AA, Kapranov NI, Kashirskaya NY, et al. Diagnostic Problems of Mucoviscidosis and Ways of Solution in Russia. *Pediatric pharmacology*. 2014; 11 (6): 16–23.
4. Kondrateva EI, Krasovskij SA, Voronkova AJu, Amelina EL, Cherniak AV, Kashirskaja N. Ju., redaktory. Registr bol'nyh mukoviscidozom v Rossijskoj Federacii. 2015 god. M.: ID MEDPRAKTIKA-M; 2016. 72 s.
5. Sherman VD, Kondrat'eva EI, Kashirskaja NJu, Kalinenkova SG, Kotalevskaja JuJu. Neonatal'nyj skрининг na mukoviscidoz. Itogi 10 let. Vtoraja Vserossijskaja nauchno-prakticheskaja konferencija «Novye tehnologii diagnostiki nasledstvennyh boleznej» Moskva, 27–28 oktjabrja 2017 g.
6. Kashirskaya NY, Krasovsky SA, Chernyak AV, Sherman VD, Voronkova AY, Shabalova LA, et al. Trends in Life Expectancy of Cystic Fibrosis Patients in Moscow and their Connection with the Treatment Received: Retrospective Analysis for 1993–2013. *Current pediatrics*. 2015; 14 (4): 503–8.
7. Sherman VD, Kashirskaja NJu, Kapranov NI. Sovremennyj algoritm diagnostiki mukoviscidoza. *Pediatrija*. 2014; 93 (4).
8. Stepanova AA, Krasovsky SA, and Polyakov AV. Reliability of the Search for 19 Common Mutations in the CFTR Gene in Russian Cystic Fibrosis Patients and the Calculated Frequency of the Disease in Russian Federation. *Russian Journal of Genetics*. 2016; 52 (2): 204–13.
9. Simakova TS, Bragin AG, Glushkova MA, Petrova NV, Polyakov AV, Kondratieva EI, et al. The experience of application of target sequencing in molecular diagnostic of mucoviscidosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 62 (5): 305–309.
10. Stepanova AA, Polyakov AV, Abruкова AV, Savaskina EN. Mutation p.E92K is the primary cause of cystic fibrosis in Chuvashes. *Russian Journal of Genetics*. 2012; 48 (7): 731–7.
11. Petrova NV, Timkovskaya EE, Vasilyeva TA et al. Characteristics the spectrum of cftr mutations in Karachay-Cherkessia. *Meditinskaja genetika* 2015; 14 (7): 32–6.
12. Krasovsky SA, Chernyak AV, Kashirskaya N.Yu. et al. Cystic fibrosis in Russia: the creation of a national register. *Pediatrics*. 2014; 93 (4).
13. Available from: <http://seqdb.med-gen.ru/>
14. Kofiadi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: Allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. *Russian Journal of Genetics*. 2006; 42 (1): 16–26.
15. Abramov DD, Kadochnikova VV, Yakimova EG, Belousova MV, Maerle AV, Sergeev IV et al. High carrier frequency of CFTR gene mutations associated with cystic fibrosis, and PAH gene mutations associated with phenylketonuria in Russian population. *Bulletin of RSMU*. 2015; (4): 32–5.
16. Sergeev IV, Haitov MR, Trofimov DJu, Abramov DD, Grudakova EG, Goncharova EV, i dr. Razrabotka metodov dlja provedenija širokomasshtabnyh issledovanij polimorfizma genov, regulirujushhih razlichnye komponenty immunnogo otveta. *Fiziol i patol immunn sistemy*. 2009; 13 (4): 21–6.
17. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca>
18. Available from: <https://www.cftr2.org/>
19. Castellani C, Cuppens H, Macek M, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008 May; 7 (3): 179–96.
20. Shin S, Kim Y, Chul Oh S, Yu N, Lee ST, Rak Choi J, et al. Validation and optimization of the Ion Torrent S5 XL sequencer and OncoPrint workflow for BRCA1 and BRCA2 genetic testing. *Oncotarget*. 2017 May 23; 8 (21): 34858–66.

ПЕРСИСТИРОВАНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ЭНТЕРОВИРУСА КОКСАКИ А7 В ПОДКОЖНЫХ МЫШИНЫХ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТАХ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

А. С. Сидоренко¹, А. О. Желтухин¹, Т. Х. Ле¹, А. В. Соболева^{1,2}, А. В. Липатова¹, Д. А. Гольбин³, П. М. Чумаков^{1,2} ✉

¹ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва

² Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова, Москва

³ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени Н. Н. Бурденко, Москва

Природные непатогенные и вакцинные штаммы энтеровирусов человека в настоящее время рассматриваются в качестве перспективных средств для лечения онкологических заболеваний, в том числе мультиформной глиобластомы — наиболее агрессивной опухоли головного мозга, для которой не существует эффективных средств терапии. Энтеровирусы могут избирательно реплицироваться в клетках опухоли, вызывая их лизис. Однако способность энтеровирусов длительно присутствовать в опухолевой ткани и совершать несколько последовательных циклов репликации с распространением от клетки к клетке плохо изучена. Целью исследования было установление возможности полного уничтожения подкожных ксенотрансплантатов глиобластом человека при однократном введении вируса внутривенной доставкой с помощью лейкоцитов периферической крови, а также длительность присутствия (персистенция) вируса в организме экспериментальных животных в процессе вирусной терапии. В качестве опухолевых клеток использовали нейросферы, полученные *in vitro* путем инкубации фрагментов удаленных у пациентов опухолей. Установлено, что лейкоциты периферической крови человека, инфицированные *in vitro*, способны осуществлять эффективную доставку в клетки опухоли вируса Коксаки А7. Однократное введение 2×10^4 зараженных вирусом лейкоцитов приводило к постепенной регрессии опухолей при постоянно определяющемся присутствии вируса в крови мыши. По результатам исследования сделан вывод, что доставка энтеровируса Коксаки А7 в опухоль может быть эффективно осуществлена с помощью лейкоцитов крови. В отсутствие полноценного иммунного ответа в опухолях у мышей наблюдается персистенция вирусов, заканчивающаяся их полным уничтожением.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, вирус Коксаки А7, вирусный онколиз, мышинные модели, ксенотрансплантаты опухолей, экспериментальная терапия, онколитические вирусы

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, уникальный код проекта RFMEFI60714X0014.

✉ Для корреспонденции: Петр Михайлович Чумаков
ул. Вавилова, д. 32, г. Москва, 119991; chumakovpm@yahoo.com

Статья получена: 13.07.2018 Статья принята к печати: 16.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.032

PERSISTENCE OF ONCOLYTIC COXSACKIE VIRUS A7 IN SUBCUTANEOUS HUMAN GLIOBLASTOMA XENOGRAFTS IN MICE IN THE CONTEXT OF EXPERIMENTAL THERAPY

Sidorenko AS¹, Zheltukhin AO¹, Le TH¹, Soboleva AV^{1,2}, Lipatova AV¹, Golbin DA³, Chumakov PM^{1,2} ✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow

³ Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow

Natural non-pathogenic and vaccine strains of human enteroviruses are currently considered as promising agents capable of treating various kinds of cancer, including glioblastoma multiforme, the most aggressive brain tumor with so far no effective therapy. Enteroviruses can selectively replicate in cancer cells and cause tumor lysis. However, the ability of enteroviruses to persist in tumor tissue for a long period of time and to replicate in several successive cycles while spreading from cell to cell remains largely unclear. This study aimed to determine the possibility of completely destroying subcutaneous mouse xenografts of human glioblastomas through a single intravenous administration of virus-carrying peripheral blood leukocytes, as well as to find out the duration of persistence of the virus in the body of experimental animals in the context of viral therapy. Neurospheres were formed *in vitro* by incubating fragments of patients-derived glioblastomas and used to initiate subcutaneous tumors in immunodeficient mice. It was established that human peripheral blood leukocytes infected *in vitro* can effectively deliver Coxsackie A7 virus to the tumor cells. A single injection of 2×10^4 virus-infected leukocytes led to a gradual regression of tumors, while the virus presence was constantly detectable in the blood of mice, up to the complete regression of the tumors. The study allows to make the conclusion that blood leukocytes can effectively deliver Coxsackie A7 virus to the tumor. In the absence of a full-fledged immune response in mice, the viruses persist in tumors leading to their complete destruction.

Keywords: glioblastoma multiforme, Coxsackie A7 virus, viral oncolysis, mice models, tumor xenografts, experimental therapy, oncolytic viruses

Funding: the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation; project code RFMEFI60714X0014.

✉ Correspondence should be addressed: Peter M. Chumakov
Vavilova 32, Moscow, 119991; chumakovpm@yahoo.com

Received: 13.07.2018 Accepted: 16.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.032

Терапия опухолей головного мозга, особенно мультиформной глиобластомы, по-прежнему остается нерешенной проблемой [1, 2]. Особое значение приобретают поиски новых альтернативных подходов к лечению. Основная их проблема связана с устойчивостью стволовых клеток опухоли к существующим терапевтическим воздействиям, приводящей к неизбежным рецидивам заболевания. Многие онколитические вирусы способны эффективно уничтожить стволовые клетки глиобластомы и предотвращать рецидивирование [3–8]. В ходе развития опухоли ее клетки приобретают ряд характерных свойств, которые могут быть использованы в качестве специфических мишеней для терапии [9]. Кроме того, они утрачивают многие функции, необходимые им для существования в многоклеточном организме [10–12]. В числе этих функций — защита клеток от вирусов [13–15]. Опухолевые клетки при заражении их вирусами, как правило, не способны индуцировать интерфероны 1 типа, но приобретают невосприимчивость к реинфекции вирусами после обработки интерферонами [16–20]. Этим обусловлена повышенная чувствительность опухолевых клеток к заражению представителями многих семейств вирусов, что лежит в основе разработки терапевтических штаммов онколитических вирусов [21–24]. Механизм действия онколитических вирусов связан не только с избирательным заражением и уничтожением раковых клеток, но и со значительной активацией противоопухолевого иммунитета и модификацией опухолевого микроокружения. Под действием онколитических вирусов происходит стимулирование врожденного и адаптивного видов иммунитета, что сопровождается стойким противоопухолевым действием даже после окончания репликации вирусов в клетках опухоли [25–28]. Представители онколитических вирусов разных семейств используют каждый из перечисленных механизмов в различной степени. Вклад прямого вирусного онколиза, вызванного непосредственным размножением вирусов в опухолевых клетках, удобно изучать на модели опухолевых ксенотрансплантатов у иммунодефицитных бестимусных мышей, у которых многие компоненты противоопухолевого иммунитета нарушены [29], или у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) [30]. Эти модели также удобны для отработки способов доставки вирусов в опухоль. Введение вируса должно приводить к эффективному заражению части опухолевых клеток, которое инициирует последующие циклы репликации вируса с выходом из зараженной клетки и перезаражением новых опухолевых клеток, находящихся в данном или отдаленном опухолевом узле. Если введение вируса непосредственно в чувствительную к вирусу опухоль возможно прямой инъекцией, то этот процесс запускается без особых затруднений. Однако в большинстве случаев метастатических форм рака, а также опухолей с затрудненным доступом, такой подход неприменим. Системное введение вируса путем внутривенных или внутримышечных инъекций зачастую тоже малоэффективно, поскольку вирус очень быстро выходит из циркуляции в результате поглощения клетками эндотелия и действия неспецифических защитных факторов крови. Перспективной альтернативой системной доставке является использование клеток-носителей — зараженных *in vitro* чувствительных к вирусу клеток, вводимых в кровотоки [31–33]. Репликация вируса в таких клетках происходит в процессе их системной циркуляции с последующим выходом инфекционных частиц в отдаленных участках организма, в том числе в опухоли. В данном исследовании мы использовали модель подкожных опухолевых ксенотрансплантатов

глиобластом человека: иммунодефицитным мышам вводили клетки из нейросферных культур, полученных из опухолевого материала двух больных с глиобластомами. Нейросферы — плотные скопления клеток, образующихся при культивировании опухолевых экплантатов в условиях, препятствующих прикреплению к поверхности чашки, и специальной среде, в составе которой имеются эпидермальный фактор роста и фактор роста фибробластов (EGF, bFGF соответственно) [34, 35]. Как и другие сфероиды, полученные из опухолей человека, нейросферы обогащены опухолевыми стволовыми клетками [36], поэтому обладают повышенной туморогенностью [37, 38]. Целью работы было отработать процедуру доставки онколитических энтеровирусов с помощью лейкоцитов периферической крови, используя модель подкожных опухолевых ксенотрансплантатов у мышей, и установить продолжительность присутствия (персистенции) вируса в организме экспериментальных животных в процессе вирусной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток для титрования вирусов

Культуру клеток Vero (иммortalизованные клетки почки африканской зеленой обезьяны) выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят (FBS), 100 мг/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. Клетки наращивали в 10-см пластиковых культуральных чашках во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, при температуре 37 °C, затем рассевали каждые 3 суток в соотношении 1:4–1:6.

Нейросферные опухолеобразующие культуры клеток глиобластомы

Происхождение и получение культур клеток из материала пациентов с глиобластомой (GM-3564 и GM-3876) описаны ранее [39]. Для повышения опухолеобразования подкожное введение нейросфер производили иммунодефицитным мышам линии SCID/Beige, используя их в качестве экспериментальных животных (штамм мышей был получен из Новосибирского SPF вивария и поддерживается в лаборатории). Нейросферы глиобластом, прошедшие не более двух пассажей в культуре, хранили при температуре жидкого азота и размораживали непосредственно перед началом экспериментов. Их высевали на среду DMEM+F12 (ПанЭко, Россия), содержащую 20 нг/мл EGF и 10 нг/мл bFGF, и помещали в инкубатор с 5% CO₂ при 37 °C. После формирования нейросфер (через 7–10 суток) их дважды отмывали физиологическим солевым раствором (PBS), подсчитывали, аккуратно пипетировали до исчезновения крупных агрегатов клеток и вводили подкожно мышам линии SCID/Beige из расчета 500 сфероидов на точку введения. Опухоли появились через 3 недели. Новообразования размером около 10 мм в диаметре иссекали, диспергировали продавливанием через стерильную нейлоновую сетку с диаметром пор 50 мкм, обрабатывали коллагеназой (ПанЭко, Москва) для получения суспензии клеток, отмывали дважды физиологическим раствором и полученную суспензию использовали для подкожного введения мышам SCID/Beige в количестве 2×10^5 клеток на точку введения с целью получения опухолей непосредственно для испытания онколитической активности вируса. Предварительная адаптация нейросфер к росту в виде опухолей на мышках

приводила к увеличению туморогенности и повышению числа образовавшихся опухолей при повторном введении животным.

Штамм онколитического вируса

В исследовании использовали штамм ЖЭВ8 энтеровируса Коксаки А7 [40, 41], который обладает способностью эффективно реплицироваться в клетках GM-3564 и GM-3876 [39]. Титрование инфекционной активности вирусных препаратов проводили методом конечных разведений на культуре клеток Vero с использованием 96-луночных планшетов.

Доставка вируса с помощью лейкоцитов периферической крови человека

Фракцию лейкоцитов периферической крови получали из свежесобранной гепаринизированной крови человека с помощью центрифугирования в растворе Ficoll-Paque (ПанЭко, Россия) согласно стандартному протоколу [42]. Отмытые дважды средой DMEM лейкоциты подсчитывали и готовили суспензию с плотностью 10^6 кл./мл. Суспензию инкубировали с вирусом Коксаки А7 (10 инфекционных единиц на клетку) при температуре 37°C в течение 1 ч. Затем лейкоциты отмывали 3 раза по 10 мл физиологическим солевым раствором (0,14 M NaCl), центрифугировали при 800 g 5 мин. Инфицированные лейкоциты в количестве 2×10^4 клеток вводили в объеме 0,1 мл в хвостовую вену мышам SCID/Beige, несущим опухоли объемом около 400–600 мкл. Наблюдение за размером опухолей проводили каждые трое суток. Для определения вируса в крови мышей каплю крови забирали из хвостовой вены и титровали на клетках Vero методом конечных серийных разведений в 96-луночных планшетах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее нами было установлено, что культуры клеток GM-3564 и GM-3876, полученные из опухолевого материала двух пациентов с глиобластомой, обладают высокой чувствительностью к вирусу Коксаки А7 [39]. В настоящем исследовании этот штамм вируса использовали для определения возможности его доставки в опухоль посредством клеточного носителя, а также для изучения его способности к длительному персистенции в опухоли, приводящему к стойкому онколитическому эффекту. Для этого была использована модель подкожных ксенотрансплантатов нейросферных культур клеток GM-3564 и GM-3876 на мышах линии SCID/Beige, имеющих комбинированную иммунную недостаточность. После подкожного введения нейросфер опухоли достигали объема 400–600 мкл за 10 суток. В эксперименте использовали две группы по 10 мышей для каждого типа опухолевых клеток (всего 4 группы): одной группе вводили в хвостовую вену инфицированные вирусом лейкоциты, другой — контрольные незараженные лейкоциты. На рис. 1 представлена динамика изменения размеров опухоли (в мм^3) при измерении каждые трое суток на протяжении 27 суток. В контрольной группе мышей при введении в хвостовую вену неинфицированных вирусом лейкоцитов рост опухолей продолжался и мышей, у которых он достигал размеров, приблизительно равных 1500 мм^3 , подвергали эвтаназии. Это происходило в интервале между 9 и 15 сутками после введения лейкоцитов. При введении в хвостовую вену инфицированных вирусами Коксаки А7 лейкоцитов увеличение объемов новообразований продолжалось еще в течение трех суток, после чего размер опухоли стремительно сокращался у мышей обеих групп, несущих клетки GM-3564 и GM-3876. Через 18–21 день после инъекций размеры опухолей уже невозможно

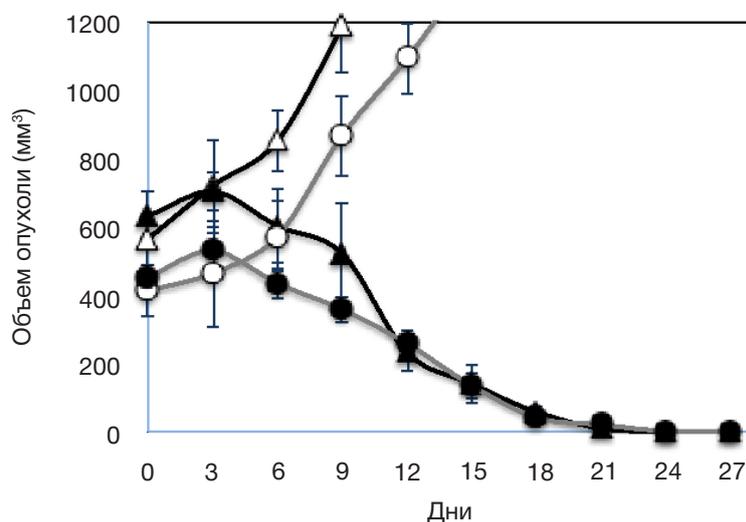


Рис. 1. Динамика изменений размеров подкожных опухолевых ксенотрансплантатов клеток глиобластомы GM-3564 и GM-3876 неинфицированных лейкоцитов человека и лейкоцитов, инфицированных вирусом Коксаки А7. Δ — введение лейкоцитов мышам с опухолями GM-3564; \blacktriangle — введение инфицированных лейкоцитов мышам с опухолями GM-3564; \circ — введение лейкоцитов мышам с опухолями GM-3876; \bullet — введение инфицированных лейкоцитов мышам с опухолями GM-3876

Таблица. Титры вируса Коксаки А7 в крови экспериментальных мышей, определенные в различные сроки после внутривенного введения инфицированных вирусом лейкоцитов

Дни	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
GM-3564	н.	$1,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	6×10^2	$1,9 \times 10^2$	н.	н.	н.
GM-3876	н.	н.	$1,0 \times 10^2$	$5,2 \times 10^3$	5×10^3	$1,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	н.	н.	н.

Примечание: н. — вирус не определяется.

было установить и на их месте подкожно выявлялась лишь малозаметная рубцовая ткань. Одновременно в крови мышей каждые трое суток определяли титр вируса (табл.).

Вирус впервые обнаруживали в крови мышей через 3 суток после введения и его количество достигало пиковых значений на 6 сутки, после чего снижалось вместе с уменьшением размеров опухолей. Вирус переставал определяться через 18–21 день после введения инфицированных лейкоцитов, когда мыши уже были практически свободны от опухолей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На модели ксенотрансплантатов глиобластомы человека, растущих на мышах с комбинированным иммунным дефицитом линии SCID/Beige нами была установлена возможность доставки онколитического вируса Коксаки А7 в опухоль с помощью лейкоцитов периферической крови человека, инфицированных вирусом *in vitro* и введенных в хвостовую вену. Такой способ введения обеспечивал появление вируса в крови в среднем через трое суток и его присутствие там вплоть до исчезновения опухолей. Таким образом, персистенция вируса в организмах мышей была обусловлена присутствием в них чувствительных к вирусу опухолевых клеток, полное уничтожение которых приводило и к исчезновению вируса. Ранее мы уже наблюдали длительную персистенцию полиовируса 1 типа у мышей с ксенотрансплантатами глиобластомы линии A172, приводящую к одновременному исчезновению опухолей и вируса в крови мышей [43]. Однако в отличие от настоящего исследования в той работе мышам внутривенно вводили высокие дозы свободного вируса. Вирус Коксаки А7 проникает в клетки с помощью белка LIMP-II, кодируемого геном SCARB2 [44]. LIMP-II экспрессируется

на поверхности многих типов клеток человека, в том числе лейкоцитов, и по-видимому, участвует в распространении вируса в организме и при энтеровирусных инфекциях, вызываемых некоторыми патогенными штаммами вирусов Коксаки А. Используемый нами способ доставки вируса в опухоль имеет ряд преимуществ перед системным введением свободных вирионов, поскольку находясь внутри клетки вирус защищен от действия антител и других факторов, ведущих к его инактивации. Мы допускаем, что внутри лейкоцитов крови вирус способен к ограниченной репликации, что обуславливает его появление в отдаленных участках организма, в том числе опухоли. Доставка с помощью лейкоцитов позволяет к тому же существенно снизить исходное количество вируса, необходимого для терапии. Дальнейшие испытания должны быть направлены на выяснение того, насколько этот способ введения пригоден для терапии онкологических больных.

ВЫВОДЫ

Установлено, что внутривенное введение онколитического штамма вируса Коксаки А7 иммунодефицитным мышам линии SCID/Beige с помощью инфицированных лейкоцитов приводит к быстрому уменьшению размеров и исчезновению подкожных ксенотрансплантатов опухолей, полученных их клеток глиобластом двух больных. При этом вирус активно размножался в организмах мышей в течение всего периода присутствия у них чувствительных опухолевых клеток. Результаты показывают, что даже в отсутствие Т-клеточного иммунитета у бестимусных мышей возможна полная деструкция глиобластомных опухолей благодаря прямому цитолитическому действию онколитического энтеровируса, а также указывает на эффективность введения вируса с помощью лейкоцитов в качестве клеточных векторов доставки.

Литература

1. Сосновцева А. О., Гриненко Н. Ф., Липатова А. В., Чумаков П. М., Чехонин В. П. Онколитические вирусы в терапии злокачественных глиом. Биомедицинская химия. 2016; 62 (4): 376–90.
2. Губанова Н. В., Гайтан А. С., Разумов И. А., Мордвинов В. А., Кривошапкин А. Л., Нетесов С. В. и др. Онколитические вирусы в терапии глиом. Молекулярная биология. 2012; 46(6): 726–38.
3. Wakimoto H, Kesari S, Farrell CJ, Curry WT, Jr, Zaupa C, Aghi M, et al. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. Cancer Res. 2009; 69 (8): 3472–81.
4. Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. Methods Mol Biol. 2012; 797: 111–25.
5. Cheema TA, Wakimoto H, Fecci PE, Ning J, Kuroda T, Jeyaretna DS, et al. Multifaceted oncolytic virus therapy for glioblastoma in an immunocompetent cancer stem cell model. Proc Natl Acad Sci USA. 2013; 110 (29): 12006–11. Epub 2013/06/12. DOI: 10.1073/pnas.1307935110. PubMed PMID: 23754388; PubMed Central PMCID: PMC3718117.
6. van den Hengel SK, Balvers RK, Dautzenberg IJ, van den Wollenberg DJ, Kloezeman JJ, Lamfers ML, et al. Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. Cancer Gene Ther. 2013; 20 (9): 507–13. Epub 2013/08/03. DOI: 10.1038/cgt.2013.47. PubMed PMID: 23907517.
7. Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie LD, Chai JN, Hubert CG, Prager BC, et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. J Exp Med. 2017; 214 (10): 2843–57. Epub 2017/09/07. DOI: 10.1084/jem.20171093. PubMed PMID: 28874392; PubMed Central PMCID: PMC5626408.
8. Csatory LK, Bakacs T. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. JAMA. 1999; 281 (17): 588–9.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144 (5): 646–74.
10. Желтухин А. О., Чумаков П. М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53. Успехи биологической химии. 2010; 50: 447–516.
11. Чумаков П. М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия. 2000; 65 (1): 28–40. PubMed PMID: 10702638.
12. Чумаков П. М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Биохимия. 2007; 72 (13): 1399–421. PubMed PMID: 18282133; PubMed Central PMCID: PMC2709848.
13. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. Nat Rev Immunol. 2014; 14 (1): 36–49. Epub 2013/12/24. DOI: 10.1038/nri3581. PubMed PMID: 24362405; PubMed Central PMCID: PMC3718117.
14. Stark GR, Darnell JE, Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. Immunity. 2012; 36 (4): 503–14. Epub 2012/04/24. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.013. PubMed PMID: 22520844; PubMed Central PMCID: PMC3390993.
15. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I

- interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15 (7): 405–14. Epub 2015/06/02. DOI: 10.1038/nri3845. PubMed PMID: 26027717.
16. Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 451: 1–14. Epub 2017/06/04. DOI: 10.1016/j.mce.2017.05.033. PubMed PMID: 28576744.
 17. Heiber JF, Barber GN. Evaluation of innate immune signaling pathways in transformed cells. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 217–38.
 18. Li Q, Tainsky MA. Epigenetic silencing of IRF7 and/or IRF5 in lung cancer cells leads to increased sensitivity to oncolytic viruses. *PLoS One.* 2011; 6 (12): e28683. Epub 2011/12/24. DOI: 10.1371/journal.pone.0028683. PubMed PMID: 22194884; PubMed Central PMCID: PMC3237484.
 19. Pikor LA, Bell JC, Diallo J-S. Oncolytic viruses: exploiting cancer's deal with the Devil. *Trends in Cancer.* 2015; 1 (4): 266–77.
 20. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* 2000; 6 (7): 821–5.
 21. Bell JC, McFadden G. Editorial overview: Oncolytic viruses-replicating virus therapeutics for the treatment of cancer. *Curr Opin Virol.* 2015; 13: viii–ix. Epub 2015/08/12. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.07.005. PubMed PMID: 26260227.
 22. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016; 107 (10): 1373–9. Epub 2016/10/30. DOI: 10.1111/cas.13027. PubMed PMID: 27486853; PubMed Central PMCID: PMC5084676.
 23. Naik S, Russell SJ. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
 24. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol.* 2012; 30 (7): 658–70.
 25. Keller BA, Bell JC. Oncolytic viruses-immunotherapeutics on the rise. *J Mol Med (Berl).* 2016; 94 (9): 979–91. Epub 2016/08/06. DOI: 10.1007/s00109-016-1453-9. PubMed PMID: 27492706.
 26. Miao D, Van Allen EM. Genomic determinants of cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2016; 41: 32–8. Epub 2016/06/03. DOI: 10.1016/j.coi.2016.05.010. PubMed PMID: 27254251.
 27. Papaioannou NE, Beniata OV, Vitsos P, Tsitsilonis O, Samara P. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Annals of translational medicine.* 2016; 4 (14): 261. Epub 2016/08/27. DOI: 10.21037/atm.2016.04.01. PubMed PMID: 27563648; PubMed Central PMCID: PMC4971375.
 28. Shen W, Patnaik MM, Ruiz A, Russell SJ, Peng KW. Immunovirotherapy with vesicular stomatitis virus and PD-L1 blockade enhances therapeutic outcome in murine acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016; 127 (11): 1449–58. Epub 2015/12/30. DOI: 10.1182/blood-2015-06-652503. PubMed PMID: 26712908; PubMed Central PMCID: PMC4797021.
 29. Liston A, Farr AG, Chen Z, Benoist C, Mathis D, Manley NR, et al. Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium. *J Exp Med.* 2007; 204 (3): 475–80. Epub 2007/03/14. DOI: 10.1084/jem.20062465. PubMed PMID: 17353370; PubMed Central PMCID: PMC2137899.
 30. Parney IF, Petruk KC, Zhang C, Farr-Jones M, Sykes DB, Chang LJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-2 combination immunogene therapy in an allogeneic Hu-PBL-SCID/beige mouse-human glioblastoma multiforme model. *Hum Gene Ther.* 1997; 8 (9): 1073–85. Epub 1997/06/10. DOI: 10.1089/hum.1997.8.9-1073. PubMed PMID: 9189765.
 31. Willmon C, Harrington K, Kottke T, Prestwich R, Melcher A, Vile R. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther.* 2009; 17 (10): 1667–76.
 32. Collet G, Grillon C, Nadim M, Kieda C. Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies. *Gene.* 2013; 525 (2): 208–16. Epub 2013/04/02. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.057. PubMed PMID: 23542073.
 33. Pan PY, Chen HM, Chen SH. Myeloid-derived suppressor cells as a Trojan horse: A cellular vehicle for the delivery of oncolytic viruses. *Oncoimmunology.* 2013; 2 (8): e25083. Epub 2013/10/02. DOI: 10.4161/onci.25083. PubMed PMID: 24083075; PubMed Central PMCID: PMC3782526.
 34. Kim SS, Pirolo KF, Chang EH. Isolation and Culturing of Glioma Cancer Stem Cells. *Current protocols in cell biology.* 2015; 67: 23.10.1–10. Epub 2015/06/11. DOI: 10.1002/0471143030.cb2310s67. PubMed PMID: 26061242; PubMed Central PMCID: PMC4471477.
 35. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015; 29 (12): 1203–17. Epub 2015/06/26. DOI: 10.1101/gad.261982.115. PubMed PMID: 26109046; PubMed Central PMCID: PMC4495393.
 36. Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, Nateri AS. Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev.* 2016; 12 (4): 492–9. Epub 2016/05/22. DOI: 10.1007/s12015-016-9664-6. PubMed PMID: 27207017.
 37. Dashzeveg NK, Taftaf R, Ramos EK, Torre-Healy L, Chumakova A, Silver DJ, et al. New Advances and Challenges of Targeting Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 2017; 77 (19): 5222–7. Epub 2017/09/21. DOI: 10.1158/0008-5472.can-17-0054. PubMed PMID: 28928129.
 38. Natsume A, Kato T, Kinjo S, Enomoto A, Toda H, Shimato S, et al. Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells. *Oncogene.* 2012; 31 (22): 2715–24. Epub 2011/10/25. DOI: 10.1038/onc.2011.466. PubMed PMID: 22020337.
 39. Желтухин А. О., Соболева А. В., Сосновцева А. О., Ле Т. Х., Ильинская Г. В., Кочетков Д. В., и др. Энтеровирусы человека проявляют избирательную онколитическую активность на модели ксенотрансплантатов мультиформной глиобластомы человека в иммунодефицитных мышцах. *Вестник РГМУ.* 2018; 2: 45–52.
 40. Чумаков П. М., Морозова В. В., Бабкин И. В., Байков И. К., Нетесов С. В., Тикунова Н. В. Онколитические энтеровирусы. *Молекулярная биология.* 2012; 46 (6): 712–25.
 41. Voroshilova MK. Interferon-producing enterovirus vaccines. (Live enterovirus vaccines, their interfering and interferonogenic activity and their use for prophylaxis of enteroviral and respiratory infections). *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1970: 117–8.
 42. Bøyum A, Scand. J. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV). *Clin Lab Invest.* 1968; 97 (21 Suppl.): 77–89.
 43. Zheltukhin AO, Sidorenko AS, Kriukova KK, Golbin DA, Tereshkova AV. Persistent virus presence during experimental oncolytic virus therapy in the model of subcutaneous mouse xenografts of human glioblastoma multiforme. *J Pharm Sci Res.* 2017; 9 (11): 2224–6.
 44. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, et al. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol.* 2012; 86 (10): 5686–96. Epub 2012/03/23. DOI: 10.1128/jvi.00020-12. PubMed PMID: 22438546; PubMed Central PMCID: PMC3347270.

References

1. Sosnovtceva AO, Grinenko NF, Lipatova AV, Chumakov PM, Chekhonin VP. Onkoliticheskie virusy v terapii zlorfchestvennyh gliom. *Biomeditsinskaja khimiia.* 2016; 62 (4): 376–90. Epub 2016/08/27. DOI: 10.18097/pbmc20166204376. PubMed PMID: 27562991.
2. Gubanov NV, Gaytan AS, Razumov IA, Mordvinov VA, Krivoshepin AL, Netesov SV, i dr. Onkoliticheskie virusy v terapii gliom. *Molekularnaja Biologija.* 2012; 46 (6): 726–38.

3. Wakimoto H, Kesari S, Farrell CJ, Curry WT, Jr, Zaupa C, Aghi M, et al. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. *Cancer Res.* 2009; 69 (8): 3472–81.
4. Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 111–25.
5. Cheema TA, Wakimoto H, Fecci PE, Ning J, Kuroda T, Jeyaretna DS, et al. Multifaceted oncolytic virus therapy for glioblastoma in an immunocompetent cancer stem cell model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (29): 12006–11. Epub 2013/06/12. DOI: 10.1073/pnas.1307935110. PubMed PMID: 23754388; PubMed Central PMCID: PMC3718117.
6. van den Hengel SK, Balvers RK, Dautzenberg IJ, van den Wollenberg DJ, Kloezeman JJ, Lamfers ML, et al. Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. *Cancer Gene Ther.* 2013; 20 (9): 507–13. Epub 2013/08/03. DOI: 10.1038/cgt.2013.47. PubMed PMID: 23907517.
7. Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie LD, Chai JN, Hubert CG, Prager BC, et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med.* 2017; 214 (10): 2843–57. Epub 2017/09/07. DOI: 10.1084/jem.20171093. PubMed PMID: 28874392; PubMed Central PMCID: PMC5626408.
8. Csatory LK, Bakacs T. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA.* 1999; 281 (17): 588–9.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144 (5): 646–74.
10. Zheltukhin AO, Chumakov PM. Povstdnevnye i induziuemye funkzii gena p53. *Uspehi biologicheskoi khimii.* 2010; 50: 447–516.
11. Chumakov PM. Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochemistry Biokhimiia.* 2000; 65 (1): 28–40.
12. Chumakov PM. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc).* 2007; 72 (13): 1399–421. Epub 2008/02/20. DOI: BCM72131399 [pii]. PubMed PMID: 18282133; PubMed Central PMCID: PMC2709848.
13. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14 (1): 36–49. Epub 2013/12/24. DOI: 10.1038/nri3581. PubMed PMID: 24362405; PubMed Central PMCID: PMC34084561.
14. Stark GR, Darnell JE, Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity.* 2012; 36 (4): 503–14. Epub 2012/04/24. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.013. PubMed PMID: 22520844; PubMed Central PMCID: PMC33909993.
15. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15 (7): 405–14. Epub 2015/06/02. DOI: 10.1038/nri3845. PubMed PMID: 26027717.
16. Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 451: 1–14. Epub 2017/06/04. DOI: 10.1016/j.mce.2017.05.033. PubMed PMID: 28576744.
17. Heiber JF, Barber GN. Evaluation of innate immune signaling pathways in transformed cells. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 217–38.
18. Li Q, Tainsky MA. Epigenetic silencing of IRF7 and/or IRF5 in lung cancer cells leads to increased sensitivity to oncolytic viruses. *PLoS One.* 2011; 6 (12): e28683. Epub 2011/12/24. DOI: 10.1371/journal.pone.0028683. PubMed PMID: 22194884; PubMed Central PMCID: PMC3237484.
19. Pikor LA, Bell JC, Diallo J-S. Oncolytic viruses: exploiting cancer's deal with the Devil. *Trends in Cancer.* 2015; 1 (4): 266–77.
20. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* 2000; 6 (7): 821–5.
21. Bell JC, McFadden G. Editorial overview: Oncolytic viruses-replicating virus therapeutics for the treatment of cancer. *Curr Opin Virol.* 2015; 13: viii–ix. Epub 2015/08/12. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.07.005. PubMed PMID: 26260227.
22. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016; 107 (10): 1373–9. Epub 2016/10/30. DOI: 10.1111/cas.13027. PubMed PMID: 27486853; PubMed Central PMCID: PMC5084676.
23. Naik S, Russell SJ. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
24. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol.* 2012; 30 (7): 658–70.
25. Keller BA, Bell JC. Oncolytic viruses-immunotherapeutics on the rise. *J Mol Med (Berl).* 2016; 94 (9): 979–91. Epub 2016/08/06. DOI: 10.1007/s00109-016-1453-9. PubMed PMID: 27492706.
26. Miao D, Van Allen EM. Genomic determinants of cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2016; 41: 32–8. Epub 2016/06/03. DOI: 10.1016/j.coi.2016.05.010. PubMed PMID: 27254251.
27. Papaioannou NE, Beniata OV, Vitsos P, Tsitsilonis O, Samara P. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Annals of translational medicine.* 2016; 4 (14): 261. Epub 2016/08/27. DOI: 10.21037/atm.2016.04.01. PubMed PMID: 27563648; PubMed Central PMCID: PMC4971375.
28. Shen W, Patnaik MM, Ruiz A, Russell SJ, Peng KW. Immunovirotherapy with vesicular stomatitis virus and PD-L1 blockade enhances therapeutic outcome in murine acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016; 127 (11): 1449–58. Epub 2015/12/30. DOI: 10.1182/blood-2015-06-652503. PubMed PMID: 26712908; PubMed Central PMCID: PMC4797021.
29. Liston A, Farr AG, Chen Z, Benoist C, Mathis D, Manley NR, et al. Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium. *J Exp Med.* 2007; 204 (3): 475–80. Epub 2007/03/14. DOI: 10.1084/jem.20062465. PubMed PMID: 17353370; PubMed Central PMCID: PMC2137899.
30. Parney IF, Petruk KC, Zhang C, Farr-Jones M, Sykes DB, Chang LJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-2 combination immunogene therapy in an allogeneic Hu-PBL-SCID/beige mouse-human glioblastoma multiforme model. *Hum Gene Ther.* 1997; 8 (9): 1073–85. Epub 1997/06/10. DOI: 10.1089/hum.1997.8.9-1073. PubMed PMID: 9189765.
31. Willmon C, Harrington K, Kottke T, Prestwich R, Melcher A, Vile R. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther.* 2009; 17 (10): 1667–76.
32. Collet G, Grillon C, Nadim M, Kieda C. Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies. *Gene.* 2013; 525 (2): 208–16. Epub 2013/04/02. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.057. PubMed PMID: 23542073.
33. Pan PY, Chen HM, Chen SH. Myeloid-derived suppressor cells as a Trojan horse: A cellular vehicle for the delivery of oncolytic viruses. *Oncoimmunology.* 2013; 2 (8): e25083. Epub 2013/10/02. DOI: 10.4161/onci.25083. PubMed PMID: 24083075; PubMed Central PMCID: PMC3782526.
34. Kim SS, Pirolo KF, Chang EH. Isolation and Culturing of Glioma Cancer Stem Cells. *Current protocols in cell biology.* 2015; 67: 23.10.1–10. Epub 2015/06/11. DOI: 10.1002/0471143030.cb2310s67. PubMed PMID: 26061242; PubMed Central PMCID: PMC4471477.
35. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015; 29 (12): 1203–17. Epub 2015/06/26. DOI: 10.1101/gad.261982.115. PubMed PMID: 26109046; PubMed Central PMCID: PMC4495393.
36. Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, Nateri AS. Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev.* 2016; 12 (4): 492–9. Epub 2016/05/22. DOI: 10.1007/s12015-016-9664-6. PubMed PMID: 27207017.
37. Dashzeveg NK, Taftaf R, Ramos EK, Torre-Healy L, Chumakova A, Silver DJ, et al. New Advances and Challenges of Targeting Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 2017; 77 (19): 5222–7. Epub 2017/09/21. DOI: 10.1158/0008-5472.can-17-0054. PubMed PMID: 28928129.
38. Natsume A, Kato T, Kinjo S, Enomoto A, Toda H, Shimato S, et al. Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells. *Oncogene.* 2012; 31 (22): 2715–24. Epub 2011/10/25. DOI: 10.1038/onc.2011.466. PubMed PMID: 22020337.
39. Zheltukhin AO, Soboleva AV, Sosnovtseva AO, Le TH, Ilyinskaya GV,

- Kochetkov DV, et al. Human enteroviruses exhibit selective oncolytic activity in the model of human glioblastoma multiforme xenografts in immunodeficient mice. *Vestn RSMU*. 2018; 2: 42–49
40. Chumakov PM, Moosova VV, Babkin IV, Baykov IK, Netesov CV, Tikunova NV. Onkoliticheskie enterovirusy. *Molekuljarnaja biologija*. 2012; 46 (6): 712–25.
41. Voroshilova MK. Interferon-producing enterovirus vaccines. (Live enterovirus vaccines, their interfering and interferonogenic activity and their use for prophylaxis of enteroviral and respiratory infections). *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1970: 117–8.
42. Bøyum A, Scand. J. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV). *Clin Lab Invest*. 1968; 97 (21 Suppl.): 77–89.
43. Zheltukhin AO, Sidorenko AS, Kriukova KK, Golbin DA, Tereshkova AV. Persistent virus presence during experimental oncolytic virus therapy in the model of subcutaneous mouse xenografts of human glioblastoma multiforme. *J Pharm Sci Res*. 2017; 9 (11): 2224–6.
44. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, et al. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol*. 2012; 86 (10): 5686–96. Epub 2012/03/23. DOI: 10.1128/jvi.00020-12. PubMed PMID: 22438546; PubMed Central PMCID: PMC3347270.

АКТИВАЦИЯ CD4⁺CD39⁺ Т-КЛЕТОК ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Г. А. Жулай¹✉, А. В. Чуров¹, Е. К. Олейник¹, А. А. Романов², П. Н. Семакова¹, В. М. Олейник¹

¹ Институт биологии, Карельский научный центр Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), Петрозаводск

² Республиканский онкологический диспансер, Петрозаводск

Патогенез колоректального рака (КРР) сопровождается значительными изменениями в состоянии иммунной системы. Однако роль аденозин-A2AR-опосредованного иммуносупрессорного механизма и в частности экспрессии молекулы энтонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы-1 (ENTPD1), или CD39, в его развитии до конца не изучена. Целью работы было исследование роли CD4⁺ Т-клеток, прежде всего экспрессирующих CD39 регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg}), в формировании иммунной супрессии при КРР, а также у больных острым панкреатитом (ОП). Экспрессию молекул лимфоцитами крови и опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (ОИЛ) анализировали методом проточной цитометрии. Содержание матричной РНК (мРНК) *CD39* в лейкоцитах периферической крови определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. В результате исследования показано, что у больных КРР накопление периферических CD4⁺CD39⁺ клеток происходит на поздних стадиях развития опухоли. Среди ОИЛ количество CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу CD39, выше, чем в крови тех же больных. Значительно повышен уровень экспрессии этой молекулы у регуляторных Т-клеток (T_{reg}) больных КРР как на периферии, так и среди ОИЛ. Установлены достоверные связи между содержанием CD4⁺CD39⁺ Т-клеток и показателями клеточного иммунитета больных КРР. Обнаружено, что уровень мРНК гена *CD39* также увеличивался в процессе развития КРР. У больных ОП, напротив, содержание мРНК гена *CD39* оставалось на уровне контроля, так же как и количество CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в периферической крови. Таким образом, можно заключить, что активация CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в процессе канцерогенеза играет важную роль и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: колоректальный рак, энтонуклеотидаза CD39, T_{reg}-клетки, транскрипционный фактор FOXP3

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания КарНЦ РАН, тема № 0221-2017-0043.

✉ **Для корреспонденции:** Галина Анатольевна Жулай
ул. Пушкинская, д. 11, г. Петрозаводск, 185014; zhgali-111@yandex.ru

Статья получена: 25.01.2018 **Статья принята к печати:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.027

ACTIVATION OF CD4⁺CD39⁺ T CELLS IN COLORECTAL CANCER

Zhulai GA¹✉, Churov AV¹, Oleinik EK¹, Romanov AA², Semakova PN¹, Oleinik VM¹

¹ Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS), Petrozavodsk

² Republic Oncology Center, Petrozavodsk

Pathogenesis of colorectal cancer (CRC) is accompanied by significant changes in the immune system. However, the role of the adenosine-A2AR-mediated immunosuppressive pathway in oncogenesis and more specifically, the expression of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (ENTPD1, also known as CD39) remains unclear. The aim of this work was to study the role of CD4⁺ T cells, most importantly CD39-expressing regulatory T cells (Tregs) in the formation of immune suppression in CRC and in patients with acute pancreatitis (AP). Expression of CD39 by peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) was measured by flow cytometry. The levels of *CD39* messenger RNA (mRNA) in the peripheral blood leukocytes were determined by real-time PCR. Our study reveals that patients with CRC accumulate peripheral CD4⁺CD39⁺ cells in the advanced stages of the disease. The proportion of CD39-expressing CD4⁺ T cells in the total pool of TILs was higher than in the peripheral blood of the same patients. Tregs of both peripheral blood and tumor specimens of CRC patients showed increased CD39 expression. We have found reliable correlations between the levels of CD4⁺CD39⁺ T cells and the parameters of cell-mediated immunity in CRC patients. Also, *CD39* mRNA levels gradually increased during CRC progression. In contrast, patients with AP have the same levels of *CD39* mRNA and peripheral blood CD4⁺CD39⁺ T cells as the controls. Finally, we conclude that activation of CD4⁺CD39⁺ T cells has an important role in oncogenesis and needs to be studied further.

Keywords: colorectal cancer, ectonucleotidase CD39, Treg cells, transcription factor FOXP3

Funding: the study was part of the State assignment for the Federal Research Center Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (Project 0221-2017-0043).

✉ **Correspondence should be addressed:** Galina A. Zhulai
Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185014; zhgali-111@yandex.ru

Received: 25.01.2018 **Accepted:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.027

Колоректальный рак (КРР) — одна из ведущих форм злокачественных новообразований среди онкологических заболеваний и причин смертности в России [1] и в мире [2, 3]. Число больных с первичным КРР постоянно растет, причем заболеваемость гораздо выше в индустриально развитых странах Европы и Северной Америки, чем в развивающихся странах Африки, Азии и Южной Америки [2]. Развитие КРР тесно связано с механизмами регуляции

иммунного ответа и сопровождается инфильтрацией опухоли иммунокомпетентными клетками [3–5]. Активно обсуждается роль хронического воспаления как фактора, способствующего развитию КРР, так как у больных с воспалительными заболеваниями кишечника увеличен риск возникновения КРР. По некоторым данным, противовоспалительная терапия снижает вероятность развития опухолей желудочно-кишечного тракта [7, 8].

В настоящее время в онкоиммунологии уделяется значительное внимание изучению эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы-1 (ENTPD1, CD39). Молекула CD39 совместно с CD73 (экто-5'-нуклеотидаза, NT5E) участвует в генерации внеклеточного аденозина. Образование внеклеточных пуриновых нуклеозидов играет фундаментальную роль в регуляции воспаления и тканевого гомеостаза. В иммунокомпетентных клетках аденозин передает сигнал преимущественно через рецептор A2A (A2AR), один из четырех аденозиновых рецепторов, связанных с G-белком. Стимуляция A2AR лимфоцитов приводит к уменьшению секреции IL2 и пролиферативной активности нативных CD4⁺ T-клеток; снижению уровня IFN γ и IL4 у T-хелперов; увеличению экспрессии молекул CTLA-4, PD1 и CD40L [8]. Иммуносупрессорный механизм, включающий взаимодействие аденозина и A2AR, способен защищать нормальные ткани от повреждений при развитии воспалительных реакций. Однако этот сигнальный путь активируется и в опухолевой ткани, особенно в ответ на гипоксию, что обеспечивает защиту раковых клеток от распознавания иммунной системой и уничтожения [9]. Роль данного механизма в развитии опухолей была продемонстрирована на экспериментальных моделях A2AR^{-/-}-мышей, у которых наблюдалась регрессия иммуногенных опухолей [10], а также мышей с нокаутом генов CD39 или CD73, отличающихся опухоль-резистентными свойствами [11, 12].

Экспрессия CD73 в опухолевой ткани описана довольно хорошо. Известно, что данный маркер экспрессируют различные типы клеток: опухолевые клетки, эндотелиальные клетки, клетки стромы [13]. Меньше известно об экспрессии в опухолевом микроокружении мембранного маркера CD39. Предполагается, что один из основных источников этой молекулы в инфильтрате опухоли — регуляторные T-клетки (T_{reg}) [14]. Используя различные супрессорные механизмы, T_{reg}-клетки способны предотвращать развитие аутоиммунных реакций и поддерживать иммунологическую толерантность [15, 16]. Ключевым транскрипционным фактором этих клеток является FOXP3, который отвечает за их развитие и супрессорную функцию [17]. При канцерогенезе T_{reg}-клетки играют негативную роль, способствуя развитию опухоли. Показано, что они присутствуют в большом количестве в периферической крови онкологических больных и ткани различных форм опухолей [18].

На сегодняшний день KPP — один из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований, однако роль аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма в его развитии до конца не изучена. Поэтому целью работы было исследование роли CD4⁺ T-клеток, экспрессирующих CD39, в формировании иммунной супрессии у больных KPP.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В работе обследовано 42 пациента с KPP, средний возраст которых составил 65 ± 12,4 лет. Критериями включения в исследование были: возраст 18–70 лет, наличие гистологически и цитологически подтвержденного диагноза «колоректальный рак». Критерии исключения: наличие других форм новообразований в анамнезе, а также иммуновоспалительных заболеваний. В качестве контроля анализировали лимфоциты 30 здоровых доноров в возрасте 54,4 ± 20,6 лет. Диагноз KPP устанавливался на основании клинических, лабораторных, эндоскопических и морфологических методов исследования. Было

диагностировано 6 человек с I стадией KPP (14,3%), 15 — с II (37%), 12 — с III (28,6%) и 9 больных с IV стадией (20%). Пациенты были разделены на две группы: в первую группу входили больные на I и II стадиях KPP, во вторую — на III и IV стадиях. Для проведения исследования было получено разрешение Комитета по медицинской этике при Министерстве здравоохранения и социального развития Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 25 от 12.02.2013 г.). Проведен анализ фенотипов клеток периферической крови, а также опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), выделенных из клинических образцов опухолевой ткани ($n = 5$) больных с III стадией KPP.

Накопление аденозина в межклеточном пространстве происходит в ответ на метаболический стресс и разрушение клетки, т. е. при ишемии, гипоксии, воспалении и травме. В связи с этим интерес представляет исследование активации CD4⁺CD39⁺ клеток в условиях развития воспаления и иммунной супрессии, не связанной с канцерогенезом. В качестве такой группы сравнения были обследованы больные острым панкреатитом (ОП). В эту группу вошли 29 человек в возрасте 44,5 ± 18 лет. Диагноз был поставлен на основе классификации, принятой на IX Всероссийском съезде хирургов в 2000 г. Критериями включения в исследование были: возраст 18–70 лет, наличие диагноза «острый панкреатит». Критерии исключения: наличие в анамнезе других нозологий, прежде всего новообразований, а также аутоиммунных патологий. Анализ лимфоцитов у больных KPP и ОП проводили до начала терапии.

Процедуру выделения ОИЛ выполняли методом ферментативной дезагрегации. Свежевыделенную ткань измельчали, переносили в среду для ферментативной дезагрегации и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 2–3 ч при комнатной температуре. Среду готовили на основе RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% FBS (HyClone, США), 100 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и 1 мг/мл коллагеназы IV (ПанЭко, Россия). Полученную суспензию пропускали через стерильные фильтры для клеток 70 и 40 мкм. Выделение фракции лимфоцитов проводили на раздельном градиенте фикола в 75% и 100%, который готовили из фикола плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия).

Экспрессию молекул клетками оценивали методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител CD4-FITC, CD8-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7 (Beckman Coulter, Франция), CD3-PE, CD16-FITC, CD19-FITC (Сорбент, Россия), FOXP3-PE (eBioscience, США), CD39 (R&D Systems, США) и соответствующих изотипических контролей. Анализ внутриклеточной экспрессии FOXP3 выполняли с применением набора буферов для фиксации и пермеабилзации (eBioscience, США). Экспрессию мРНК CD39 определяли методом ПЦР в реальном времени. Выделение и очистку нуклеиновых кислот проводили с помощью набора «AxyPrep Blood Total RNA Miniprep Kit» (Axygen, США). Для синтеза кДНК использовали случайные гексапраймеры и MMLV-обратную транскриптазу (Силекс, Россия). Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени выполняли с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Eurogen, Россия) на приборе «iCycler Thermal Cycler» (Bio-Rad, США). Анализ полученных данных проводили методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где Ct — пороговый цикл, а ΔCt — разница между значениями пороговых циклов для референсного (*GAPDH*) и целевого

(CD39) генов. Итоговый уровень экспрессии исследуемого гена рассчитывали относительно контроля (здоровые доноры), принимая за единицу величину экспрессии исследуемого гена в контроле. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0», достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Исследование выполнено на научном оборудовании «Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ЦКП КарНЦ РАН).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе определяли содержание CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в периферической крови и среди ОИЛ у больных КРР. Обнаружено, что количество CD4⁺CD39⁺ Т-клеток на периферии как у здоровых, так и у больных лиц сильно варьирует. При КРР на поздних стадиях содержание CD4⁺CD39⁺ лимфоцитов было выше, чем в контроле ($p < 0,05$). В то же время у больных с I и II стадиями КРР значительных отличий в содержании CD4⁺CD39⁺ клеток не отмечено (рис. 1).

В опухолевой ткани среди лимфоцитов количество CD4⁺CD39⁺ Т-клеток было в 4 раза выше, чем в периферической крови тех же больных (рис. 2А).

Повышенное содержание CD4⁺CD39⁺ Т-клеток было отмечено и среди CD4⁺ Т-лимфоцитов (рис. 2Б). Также увеличенное количество CD39⁺ клеток среди ОИЛ наблюдалось в популяции Т-клеток, не несущих на своей

поверхности CD4 (рис. 2В). При этом в опухолевой ткани доля CD4⁺CD39⁺ клеток была больше, чем CD4⁺CD39⁻ ($p < 0,05$), чего не отмечено среди лимфоцитов, циркулирующих в крови.

Ранее мы исследовали у больных КРР популяционный состав периферических лимфоцитов (Т-клетки и их субпопуляции, В-клетки и NK-клетки, или естественные киллеры) [19]. Результаты цитометрического анализа представлены в табл. 1.

У больных КРР по сравнению с контролем снижено число В-лимфоцитов, как на начальных стадиях развития заболевания, так и на поздних ($p < 0,05$). Изменения количества CD3⁺ Т-лимфоцитов отмечены для больных с III–IV стадиями КРР. На всех стадиях развития КРР наблюдалось пониженное число CD4⁺ Т-хелперов ($p < 0,05$) и активированных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток ($p < 0,05$), а также повышенное количество CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ, $p < 0,05$). У больных КРР в уровне NK-клеток достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено.

Мы выявили связь изменений в популяционном составе лимфоцитов с количеством CD4⁺CD39⁺ Т-клеток у больных КРР. Отмечена отрицательная корреляция между количеством CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов и CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($r = -0,60$, $p < 0,05$), между количеством CD3⁺CD19⁺ В-клеток и CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($r = -0,40$, $p < 0,05$), а также между значением иммунорегуляторного индекса (отношение клеток CD4⁺/CD8⁺) и количеством CD4⁺CD39⁺ Т-клеток ($r = -0,58$, $p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют об участии CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в иммуносупрессии при развитии КРР.

Важную роль при канцерогенезе играет субпопуляция T_{reg}-клеток. Кроме того, экспрессия T_{reg}-клетками молекулы CD39 и участие в генерации внеклеточного аденозина

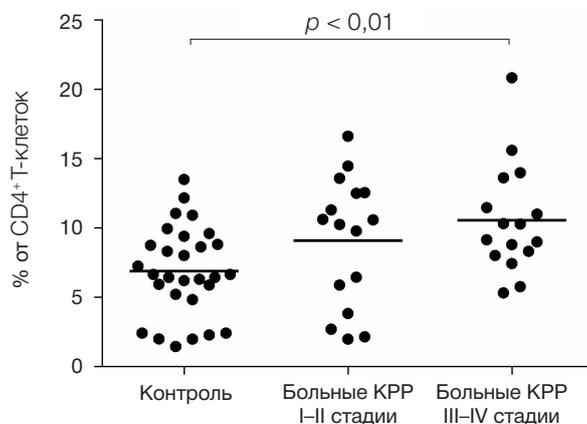


Рис. 1. Влияние КРР на содержание CD4⁺CD39⁺ Т-клеток в периферической крови

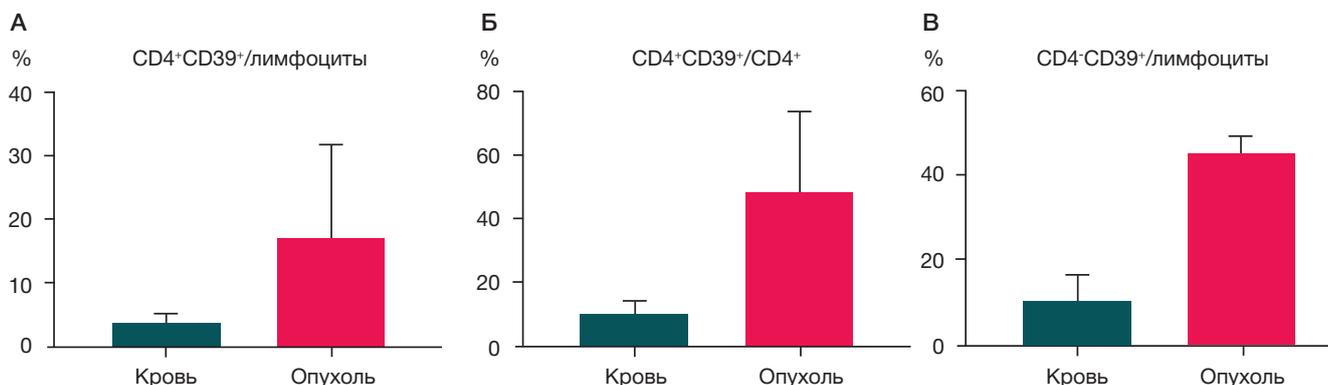


Рис. 2. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD39, в периферической крови и опухолевой ткани больных КРР
Примечание: * — различия достоверны при $p < 0,05$.

рассматривается как один из основных механизмов супрессии иммунного ответа [15, 16]. Мы исследовали содержание T_{reg} -клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$. У больных с I-II стадиями КРР количество $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клеток было увеличено по сравнению со здоровыми донорами, тогда как у больных на поздних стадиях КРР количество этих клеток не отличалось от контроля (табл. 1). Было показано, что в крови онкологических больных на T_{reg} -клетках ($CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$, $CD4^+CD25^{hi}$) происходит усиление уровня экспрессии молекулы CD39 (табл. 2).

Как видно из табл. 2, экспрессия CD39 у $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клеток увеличивается уже на начальных этапах (I-II стадии) развития опухоли по сравнению с контролем и достигает максимальных значений у больных с более поздними стадиями КРР. Такая же закономерность наблюдалась и для $CD4^+CD25^{hi}$ T_{reg} -клеток. Тогда как у клеток с фенотипом $CD4^+CD25^-$ уровень экспрессии CD39 был довольно низким и не отличался от контроля.

Кроме того, в данной работе исследовали экспрессию транскрипционного фактора T_{reg} -клеток FOXP3 и ее связь с экспрессией CD39. Показано, что между экспрессией CD39 и экспрессией FOXP3 в $CD4^+CD25^{hi}$ T_{reg} -клетках в крови больных КРР существует прямая корреляция ($r = 0,51$, $p < 0,05$). Среди ОИЛ $CD4^+CD25^{hi}$ T_{reg} -клетки также отличались от периферических более высокой экспрессией CD39. При этом почти все ОИЛ с фенотипом $CD4^+CD25^{hi}$ экспрессировали маркер CD39 (табл. 2). Однако повышенная экспрессия этой молекулы наблюдалась и у нерегуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^-$ по сравнению с периферическими лимфоцитами этих же больных. Полученные данные свидетельствуют о том, что опухоль стимулирует экспрессию CD39 на различных субпопуляциях $CD4^+$ T -лимфоцитов, включая T_{reg} -клетки.

Исследование изменения субпопуляционного состава лимфоцитов и относительного количества T_{reg} -клеток проводили и у больных ОП (табл. 1). Содержание T -лимфоцитов и $CD4^+$ T -клеток, а также количество

активированных T -хелперов у больных ОП было ниже, чем в контроле. Однако уровень экспрессии CD25 в T -хелперах больных ОП был выше, чем в контроле ($25,37 \pm 8,6\%$ и $18,09 \pm 7,5\%$ от числа $CD4^+$ T -клеток соответственно, $p < 0,05$). Изменения в соотношении субпопуляций T -клеток отразились в значительном снижении иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Показано, что у больных ОП увеличено содержание $CD8^+$ ЦТЛ и NK -клеток по сравнению со здоровыми донорами. Таким образом, больные ОП, так же как больные КРР проявляли признаки ослабления иммунитета. Кроме того, было обнаружено, что у больных ОП число периферических $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клеток выше, чем в контроле (табл. 1).

В результате исследования экспрессии молекулы эктонуклеотидазы CD39 было обнаружено, что у больных ОП количество $CD4^+CD39^+$ T -клеток составило $9,16 \pm 2,9\%$ от $CD4^+$ T -клеток. Показано, что в уровне экспрессии CD39 T_{reg} -клетками больных ОП наблюдалась схожая с КРР закономерность. Экспрессия этой молекулы была выше в T_{reg} -клетках ($p < 0,05$) у больных ОП. Так, уровень экспрессии CD39 T_{reg} -клетками с фенотипом $CD4^+CD25^{hi}$ у больных ОП составил $57,98 \pm 19,6\%$, тогда как в $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клетках — $62,09 \pm 16,4\%$. У $CD4^+CD25^-$ лимфоцитов, не относящихся к T_{reg} -клеткам, уровень экспрессии CD39 составил $7,67 \pm 4,3\%$, достоверных отличий от контроля не выявлено.

Как и при КРР, мы исследовали степень вовлеченности популяции $CD4^+CD39^+$ T -клеток в иммунную супрессию больных ОП. Однако в результате корреляционного анализа содержания $CD4^+CD39^+$ T -клеток, уровня экспрессии этой молекулы в $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ T_{reg} -клетках и количественных изменений в популяционном составе лимфоцитов больных ОП не выявили ни одной достоверной связи, как это было при КРР.

Кроме того, нами был исследован относительный уровень экспрессии мРНК гена CD39 в лейкоцитах периферической крови больных КРР и ОП. Обнаружено, что у больных КРР уровень мРНК этого гена был в 2,36

Таблица 1. Содержание основных популяций лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров, больных КРР и больных ОП в % от общего числа лимфоцитов

Фенотипы	Контроль	Больные КРР		Больные ОП
		I-II стадии	III-IV стадии	
CD3 ⁺ (T-клетки)	69,26 ± 5,3	66,96 ± 6,4	64,02 ± 6,4*	63,87 ± 7,1*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (T-хелперы)	42,39 ± 6,4	32,80 ± 9,5*	35,66 ± 5,9*	34,46 ± 9,1*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ (активированные T-хелперы)	10,74 ± 5,2	6,46 ± 2,7*	5,57 ± 1,8*	7,90 ± 3,2*
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (ЦТЛ)	21,98 ± 4,7	31,45 ± 6,1*	27,28 ± 6,5*#	28,20 ± 7,7*
CD3 ⁺ CD19 ⁺ (B-лимфоциты)	11,15 ± 3,0	8,13 ± 4,3*	5,99 ± 2,8*	7,90 ± 5,2
CD3 ⁺ CD16 ⁺ (NK-лимфоциты)	14,84 ± 5,7	13,39 ± 4,8	15,56 ± 8,5	17,65 ± 7,2*
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (иммунорегуляторный индекс)	2,07 ± 0,5	1,12 ± 0,5*	1,40 ± 0,4*	1,36 ± 0,7*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} (T_{reg} -клетки)	4,56 ± 1,0	5,34 ± 1,9*	4,7 ± 1,4	6,83 ± 2,7*

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$, # — различия достоверны по сравнению с показателями пациентов с I-II стадиями КРР при $p < 0,05$.

Таблица 2. Уровень экспрессии эктонуклеотидазы CD39 в популяции $CD4^+$ T -клеток у больных КРР в % от $CD4^+$ T -клеток

	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-}
Контроль	5,58 ± 3,9	42,70 ± 5,8	41,25 ± 2,7
Больные КРР I-II стадии	5,97 ± 3,6	53,85 ± 3,9*	55,32 ± 4,1*
Больные КРР III-IV стадии	7,54 ± 3,3	66,14 ± 3,4**	67,87 ± 2,9**
ОИЛ	35,76 ± 22,6*	90,06 ± 7,1#	Нет данных

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем, ** — различия достоверны по сравнению с контролем и группой пациентов с I-II стадиями КРР, # — различия достоверны по сравнению с периферическими лимфоцитами тех же пациентов с КРР.

раза выше, чем в контроле (рис. 3). У больных ОП не было выявлено существенных отличий в уровне экспрессии транскриптов *CD39*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внеклеточный аденозин — сигнальная молекула, модулирующая многие физиологические процессы. В последнее время активно исследуется аденозин-опосредованная супрессия иммунного ответа как один из ключевых механизмов резистентности опухоли к иммунологическому надзору. Образуется аденозин дефосфорилированием аденозинмонофосфата (АМФ) в межклеточном пространстве. Одним из ключевых ферментов в этом процессе служит эктонуклеотидаза *CD39*, обеспечивающая превращение аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ) до АМФ [8, 9].

В настоящей работе исследовали роль $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих *CD39*, в формировании иммунной супрессии у больных КРР. Нами было показано, что у больных КРР накопление периферических $CD4^+CD39^+$ клеток происходит на поздних стадиях развития опухоли. Среди ОИЛ количество $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих молекулу *CD39*, значительно выше, чем в крови тех же больных. Кроме того, у обследованных онкологических больных существует отрицательная корреляция между содержанием $CD4^+CD39^+$ Т-клеток и другими показателями, такими как количество $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD3^+CD19^+$ В-клеток и значение ИПИ, что свидетельствует об участии $CD4^+CD39^+$ Т-клеток в иммуносупрессии при развитии КРР.

Важную роль в формировании иммунной супрессии при канцерогенезе и поддержании опухолевого роста отводят популяции T_{reg} -клеток. Недавно было продемонстрировано, что T_{reg} -клетки могут участвовать в накоплении внеклеточного аденозина. Они отличаются от других Т-лимфоцитов повышенной экспрессией молекулы *CD39*, необходимой для супрессорной активности этих клеток [20, 21]. Было показано, что T_{reg} -клетки, выделенные из крови $CD39^{-/-}$ -мышей проявляют низкий уровень супрессорной активности *in vitro* и не могут предотвращать отторжение трансплантата *in vivo* [22]. Поверхностная экспрессия *CD73*

(нуклеотидазы, дефосфорилирующей АМФ до аденозина) совместно с *CD39* определяется у $CD4^+CD25^+ T_{reg}$ клеток мышей. У человека $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клетки обладают крайне низким уровнем экспрессии *CD73* [23], но при этом уровень экспрессии *CD73* в цитоплазме этих клеток выше по сравнению с $CD4^+CD25^-$ Т-лимфоцитами [21]. Более того, было продемонстрировано прямое накопление аденозина в культуре T_{reg} -клеток человека, подтверждающее, что в этих клетках *CD73* присутствует в активной форме.

В нашей работе показано, что в крови больных КРР уровень экспрессии маркера *CD39* в клетках с фенотипами $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ был значительно выше у всех обследованных больных. При этом усиление экспрессии эктонуклеотидазы зависело от стадии заболевания. Среди ОИЛ $CD4^+CD25^{hi} T_{reg}$ -клетки также отличались от периферических более высокой экспрессией этой молекулы. Таким образом, можно заключить, что в результате процесса рекрутинга из периферического пула лимфоцитов, среди ОИЛ происходит накопление T_{reg} -клеток с высокой экспрессией *CD39*. Эти клетки являются одной из доминирующих субпопуляций T_{reg} при развитии КРР, особенно на более поздних стадиях заболевания. Кроме того, $CD39^+ T_{reg}$ -клетки отличает более высокая иммуносупрессорная активность, что может оказывать негативный эффект при развитии заболевания наряду с другими механизмами иммунной супрессии.

Развитие ОП, особенно в деструктивной форме, тоже сопровождается изменением реактивности иммунной системы. Это заболевание характеризуется воспалением поджелудочной железы с возможным вовлечением перипанкреатических тканей и формированием полиорганной функциональной недостаточности, которая в свою очередь возникает в следствие панкреонекроза, развития инфекции и сепсиса [24]. Предполагается, что выраженность иммунных характеристик синдрома системного воспалительного ответа может индуцировать развитие иммуносупрессии, что приводит к неспособности организма противостоять микробной агрессии и, как следствие, к развитию гнойно-некротических осложнений [25].

Полученные нами данные об изменениях в субпопуляционном составе лимфоцитов, повышенном содержании T_{reg} -клеток у больных ОП могут свидетельствовать

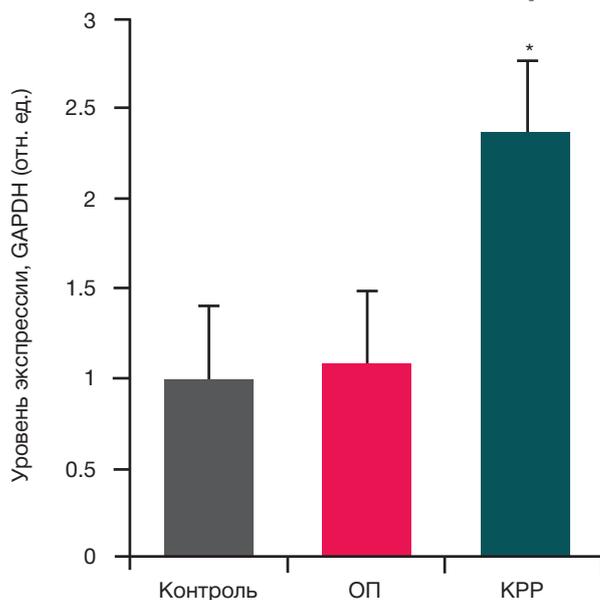


Рис. 3. Изменение уровня мРНК гена *CD39* в лейкоцитах периферической крови больных КРР и ОП (относительно мРНК *GAPDH*)

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$, данные представлены в виде $M \pm SE$.

о развитии иммунной супрессии при данном заболевании. Учитывая повышенное содержание T_{reg} -клеток, а также воспалительный характер заболевания и увеличение уровня апоптоза циркулирующих лимфоцитов [26], предполагается, что развитие иммунной супрессии у таких больных представляет компенсаторный механизм, ограничивающий развитие воспалительной реакции.

В отличие от пациентов с КРР, у больных ОП содержание $CD4^+CD39^+$ клеток не отличалось от контроля. Не выявлено корреляции между содержанием основных популяций лимфоцитов и уровнем $CD4^+CD39^+$ Т-клеток. Отмечено, что у больных ОП был увеличен уровень экспрессии $CD39$ на T_{reg} -клетках ($CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$) по сравнению с контролем, что, возможно, связано с повышенным количеством самих T_{reg} -клеток в крови этих больных. По-видимому, у больных ОП $CD4^+CD39^+$ Т-клетки не вносят значительного вклада в развитие системной иммуносупрессии, как при канцерогенезе. Об этом также свидетельствуют полученные нами результаты анализа относительного уровня мРНК гена $CD39$ у больных КРР и ОП. Было показано, что у больных КРР уровень мРНК

$CD39$ увеличивался в процессе развития заболевания, достигая максимальных значений на поздних стадиях КРР. В то же время, у больных ОП уровень экспрессии $CD39$ не отличался от контроля.

ВЫВОДЫ

В условиях развития КРР значительно повышается количество $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих маркер $CD39$, особенно интенсивное накопление $CD39^+$ клеток наблюдается среди ОИЛ. Эти клетки играют существенную роль в формировании иммунной супрессии у больных КРР. Значительную долю клеток, экспрессирующих $CD39$, составляют T_{reg} -лимфоциты. Блокировка экспрессии эктонуклеотидазы $CD39$ и/или ограничение функционирования T_{reg} -клеток представляет интерес для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии. Необходимы дальнейшие исследования для детального понимания механизмов аденозин- A_2A R-опосредованной иммунной супрессии у онкологических больных.

Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2015. М.: МНИОИ им. Герцена; 2016. 250 с.
- Циммерман Я. С. Колоректальный рак: современное состояние проблемы. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2012; 22 (4): 5–17.
- Mougiakakos D. Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance. *Cancers*. 2011; 3: 1708–31.
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 186–92.
- Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumor-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol.* 2010; 222 (4): 4350–66.
- Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, Stokkers PC, van der Woude CJ, Hommes DW, et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2008; 57: 1246–51.
- Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol.* 2016; 17 (3): 230–40.
- Antonioni L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13: 842–57.
- Antonioni L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013; 19: 355–67.
- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 5947–52.
- Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enyaji K, Cszimadia E, et al. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in *cd39/Entpd1*-null mice. *Am J Pathol.* 2007; 171: 1395–404.
- Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Moller A, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res.* 2012; 72: 2190–6.
- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 2012; 33: 231–7.
- Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene.* 2013; 32: 1743–51.
- Кравченко П. Н., Жулай Г. А., Чуров А. В., Олейник Е. К., Олейник В. М., Барышева О. Ю. и др. Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом. Вестник РАМН. 2016; 71(2): 148–153.
- Чуров А. В. Регуляторные Т-клетки и старение организма. Успехи геронтологии. 2013; 26 (4): 603–609.
- Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological Reviews.* 2014; 259 (1): 192–205.
- Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63: 67–72.
- Жулай Г. А., Олейник Е. К., Романов А. А., Олейник В. М., Чуров А. В., Кравченко П. Н. Циркулирующие регуляторные Т-клетки и изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у больных колоректальным раком. Вопросы онкологии. 2016; 62 (1): 96–100.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007; 204: 1257–65.
- Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czyszowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2010; 285: 7176–86.
- Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol.* 2010; 185: 1993–98.
- Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* 2007; 3: 171–80.
- Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 675–84.
- Винник Ю. С., Черданцев Д. В., Салмина А. Б., Маркелова Н. М., Миллер С. В. Особенности регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток крови при остром деструктивном панкреатите. Новости хирургии. 2011; 9 (2): 37–42.
- Zhang XP, Chen HQ, Liu F, Zhang J. Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009; 10 (7): 493–8.

References

1. Kaprin AD, Starinski VV, Petrova GV. Sostoyanie onkologicheskoi pomoshi naseliniyu Rossii v 2015. M.: MNIOL im. Gerchena; 2016. 250 s. Russian.
2. Tsimmerman YaS. Colorectal cancer: state-of-the-art. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2012; 22 (4): 5–17. Russian.
3. Mougiakakos D. Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance. *Cancers*. 2011; 3: 1708–31.
4. Salama P, Phillips M, Grien F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 186–92.
5. Noshu K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol*. 2010; 222 (4): 4350–66.
6. Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, Stokkers PC, van der Woude CJ, Hommes DW, et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008; 57: 1246–51.
7. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016; 17 (3): 230–40.
8. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13: 842–57.
9. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 355–67.
10. Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 5947–52.
11. Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enjyoji K, Cszimadia E, et al. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol*. 2007; 171: 1395–404.
12. Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Moller A, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res*. 2012; 72: 2190–6.
13. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 2012; 33: 231–7.
14. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 2013; 32: 1743–51.
15. Kravchenko PN, Zhulai GA, Churov AV, Oleinik EK, Oleinik VM, Barysheva OYu, i dr. Subpopulations of Regulatory T-lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 71 (2): 148–153. Russian.
16. Churov AV. Regulatory T cells and aging. *Advances in gerontology*. 2013; 26 (4): 603–609. Russian.
17. Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological Reviews*. 2014; 259 (1): 192–205.
18. Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother*. 2014; 63: 67–72.
19. Zhulai GA, Oleinik EK, Romanov AA, Oleinik VM, Churov AV, Kravchenko PN. Circulating regulatory T-cells and changes in the subpopulation composition of lymphocytes in colorectal cancer patients. *Problems in oncology*. 2016; 62 (1): 96–100. Russian.
20. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204: 1257–65.
21. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 7176–86.
22. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol*. 2010; 185: 1993–98.
23. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 2007; 3: 171–80.
24. Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 675–84.
25. Vinnik YuS, Cherdancev DV, Salmina AB, Markelova NM, Miller SV. Osobennosti regulyatsii apoptoza immunokompetentnih kletok pri ostrom destruktivnom pankreatite. *Novosti hirurgii*. 2011; 9 (2): 37–42. Russian.
26. Zhang XP, Chen HQ, Liu F, Zhang J. Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10 (7): 493–8.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА NOS3 786C/T НА УРОВЕНЬ ОКСИДА АЗОТА У КОМОРБИДНЫХ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

А. В. Шаханов[✉], О. М. Урясьев

Кафедра факультетской терапии с курсами эндокринологии, клинической фармакологии, профессиональных болезней, Рязанский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Рязань

В патогенезе бронхиальной астмы и гипертонической болезни значимую роль играет оксид азота, в синтезе которого участвуют ферменты NO-синтазы. Нуклеотидный состав генов может оказывать влияние на активность фермента, поэтому представляется актуальным изучение влияния полиморфизма гена NOS3 786C/T (rs2070744) на уровни оксида азота в крови и выдыхаемом воздухе у больных, страдающих бронхиальной астмой и гипертонической болезнью. В исследовании участвовал 71 пациент. В основную группу входили 24 пациента, страдающих одновременно бронхиальной астмой и гипертонической болезнью. Еще две группы сравнения включали больных с изолированной бронхиальной астмой и больных с изолированной гипертонической болезнью. У всех пациентов определяли полиморфизм NOS3 786C/T, измеряли уровень суммарных метаболитов оксида азота в крови фотоколориметрическим методом в реакции с реактивом Грисса и выявляли уровень выдыхаемой фракции оксида азота электрохимическим методом с помощью портативной тест-системы NObreath. Уровень метаболитов оксида азота в крови пациентов — носителей генотипа CC полиморфизма NOS3 786C/T составил 69,7 (60,0; 70,4) мкмоль/л, генотипа CT — 68,9 (57,7; 77,4) мкмоль/л, генотипа TT — 67,7 (59,7; 79,3) мкмоль/л ($p = 0,843$). В отдельных исследуемых группах была отмечена отчетливая связь полиморфизма NOS3 786C/T и уровня оксида азота в крови. У больных бронхиальной астмой и больных гипертонической болезнью уровень метаболитов оксида азота в крови достоверно нарастает в ряду CC < CT < TT ($p = 0,033$ и $p = 0,024$ соответственно). Таким образом, C-аллель полиморфизма NOS3 786C/T ассоциирована с более низким уровнем метаболитов оксида азота в крови больных, страдающих бронхиальной астмой и гипертонической болезнью.

Ключевые слова: астма, полиморфизм, оксид азота, гипертоническая болезнь

✉ **Для корреспонденции:** Антон Валерьевич Шаханов
ул. Высоковольная, д. 9, г. Рязань, 390026; shakhanovav@gmail.com

Статья получена: 20.04.2018 **Статья принята к печати:** 19.06.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.029

EFFECT OF THE NOS3 786C/T POLYMORPHISM ON THE LEVELS OF NITRIC OXIDE IN PATIENTS WITH ASTHMA AND COMORBID HYPERTENSION

Shakhanov AV[✉], Uryasev OM

Department of Intermediate Therapy,
Ryazan State Medical University, Ryazan

Nitric oxide has a significant role in the pathogenesis of bronchial asthma and hypertension. Its synthesis is catalyzed by NO synthases. The nucleotide composition of genes coding for these enzymes can affect their activity; therefore, it is important to understand the effect of the NOS3 786C/T polymorphism (rs2070744) on the blood levels of nitric oxide in patients with bronchial asthma and hypertension. Our study recruited 71 individuals. The main group consisted of 24 asthmatic hypertensive patients. Two comparison groups included patients with isolated asthma and isolated hypertension. All patients were genotyped for the NOS3 786C/T polymorphism. We measured total nitric oxide metabolites in their blood using a photocolometric technique and the Griess reagent. The levels of nitric oxide in the exhaled air were determined electrochemically using a portable NObreath monitor. The blood levels of nitric oxide metabolites amounted to 69.7 (60.0; 70.4) $\mu\text{mol/l}$ in the CC genotype carriers, 68.9 (57.7; 77.4) $\mu\text{mol/l}$ in the CT genotype carriers and 67.7 (59.7; 79.3) $\mu\text{mol/l}$ in the patients with the TT genotype ($p = 0.843$). Individually, the groups demonstrated a clear association between the NOS3 786C/T polymorphism and the blood levels of nitric oxide metabolites. The patients with bronchial asthma and hypertension demonstrated a tendency to increasing nitric oxide levels following the pattern CC < CT < TT ($p = 0.033$ and $p = 0.024$, respectively). Thus, the C allele of the NOS3 786C/T polymorphism is associated with lower blood levels of nitric oxide metabolites in patients with bronchial asthma and hypertension.

Keywords: asthma, polymorphism, nitric oxide, hypertension

✉ **Correspondence should be addressed:** Anton V. Shakhanov
Vysokovolnaya 9, Ryazan, 390026; shakhanovav@gmail.com

Received: 20.04.2018 **Accepted:** 19.06.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.029

На сегодняшний день внимание ученых все больше привлекает проблема коморбидности, изучение которой позволяет реализовать персонализированный подход к ведению пациентов. Высокую социальную значимость имеет проблема бронхиальной астмы, занимающей второе место по распространенности среди заболеваний органов дыхания. Около половины больных бронхиальной астмой страдает сердечно-сосудистыми заболеваниями, среди которых ключевое место занимает гипертоническая болезнь (13–38%) [1]. Многие аспекты сочетанного течения бронхиальной астмы и гипертонической болезни до сих пор остаются неясными, однако не вызывает сомнения существование феномена взаимного влияния этих заболеваний [2].

Одним из возможных механизмов такого влияния является нарушение синтеза оксида азота (NO), который считается сигнальной молекулой межклеточного взаимодействия [3]. Синтез NO в эндотелии регулирует тонус сосудов, кровотока и артериальное давление, при этом нарушение его выработки способствует развитию артериальной гипертензии и формированию эндотелиальной дисфункции [4–7]. Кроме того, NO рассматривается как регулятор тонуса и просвета дыхательных путей, а в малых концентрациях препятствует бронхоспазму, что важно в предотвращении развития бронхиальной астмы [8–10].

В организме NO синтезируется из L-аргинина при участии группы цитохром P-450-подобных гемопротеинов — синтаз оксида азота (NOS), включающих три известные изоформы: нейронную (nNOS), макрофагальную (iNOS) и эндотелиальную (eNOS) [5]. Изоформы являются продуктами экспрессии генов *NOS1*, *NOS2* и *NOS3* соответственно. Наибольшее значение в развитии атеросклероза, артериальной гипертензии и эндотелиальной дисфункции имеет эндотелиальная синтаза оксида азота, кодируемая геном *NOS3*. Как видно из названия, она определяется в основном в клетках эндотелиальных сосудов. В физиологических условиях эта изоформа конститутивна, но при различных патологических состояниях ее экспрессия индуцируется, что сопровождается повышенным образованием NO [11]. Физиологическая продукция оксида азота под действием конститутивной NO-синтазы направлена на поддержание тканевого равновесия в метаболизме NO. NO-синтазы играют важную роль в продукции NO в ранней фазе воспаления, тем самым проявляя свой провоспалительный эффект. В то же время NO-синтазы контролируют биосинтез интерлейкинов IL4, IL11, IL13, относящихся к ингибиторам воспалительной реакции. Таким образом, NO-синтазы и продуцируемый ими оксид азота оказываются «подлинными» регуляторами воспаления, в том числе при бронхиальной астме [12].

Активность экспрессии NO-синтаз напрямую зависит от нуклеотидного состава кодирующих генов. Таким образом, способность NO выступать в качестве физиологического регулятора или возможного токсического агента может быть обусловлена активностью изоформ NO-синтазы, которая изменяется при наличии мутаций генов *NOS*. Множество исследований посвящено изучению полиморфизма генов *NOS* и их роли в течение заболеваний и синтезе оксида азота, при этом роль отдельного полиморфизма в развитии многофакторных заболеваний, как правило, невелика. Участие оксида азота и генов, его продуцирующих, в патогенезе бронхиальной астмы и гипертонической болезни не вызывает сомнений. Но их роль при формировании коморбидной патологии остается до конца не ясной. Среди многообразия полиморфизмов *NOS3* представляется интересным изучение полиморфизма 786C/T (rs2070744) связанного с развитием

ишемической болезни и инфаркта миокарда, которые также ассоциированы с нарушением эндотелиальной продукции оксида азота, как и гипертоническая болезнь [13, 14]. Целью исследования стало изучение влияния полиморфизма гена *NOS3* 786C/T на уровни оксида азота в крови и выдыхаемом воздухе у больных, страдающих бронхиальной астмой и гипертонической болезнью.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в рамках диссертационного исследования на кафедре факультетской терапии Рязанского государственного медицинского университета имени И. П. Павлова с 2014 по 2017 годы [15]. На проведение эксперимента с участием людей получено одобрение Локального этического комитета РязГМУ (протокол № 2 от 02.10.2014 г.) Этические принципы проведения исследования соответствовали требованиям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и правилам Надлежащей клинической практики.

В исследование включен 71 пациент, проходивший стационарное лечение в областной клинической больнице (г. Рязань) по поводу бронхиальной астмы или гипертонической болезни. Пациенты были разделены на три группы. В основную группу вошли 24 пациента, страдающих сочетанием бронхиальной астмы и гипертонической болезни. Две группы сравнения включали больных с изолированной бронхиальной астмой ($n = 23$) и больных с изолированной гипертонической болезнью ($n = 24$). Исследуемые группы были сопоставимы по полу и возрасту и включали не состоящих в родстве представителей европеоидной расы, проживающих на территории Рязанской области. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения в исследование: мужчины и женщины в возрасте 45–69 лет; диагноз «бронхиальная астма, смешанная форма» и/или «гипертоническая болезнь», установленный согласно глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы и рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов / Российского кардиологического общества соответственно. Пациентов, страдающих бронхиальной астмой, включали в исследование после купирования обострения и отмены системных ГКС или перевода на поддерживающие дозы системных ГКС, если больной получал их до поступления в стационар. Критерии исключения: беременность и период лактации; приступный период бронхиальной астмы; заболевания сердечно-сосудистой системы в стадии декомпенсации; наличие психозов и психиатрических заболеваний в анамнезе; наличие тяжелых нарушений функции печени и почек в анамнезе; наличие иных сопутствующих заболеваний и состояний, способных оказывать влияние на функцию дыхательной и сердечно-сосудистой систем и исследуемые показатели; злоупотребление и/или зависимость от психоактивных веществ и/или алкоголя. Пациенты, страдающие гипертонической болезнью в обеих исследуемых группах получали сходное лечение. Исследуемые группы не различались по количеству курящих пациентов ($p = 0,441$).

Определение суммарного уровня метаболитов оксида азота проводили в сыворотке крови фотоколориметрическим методом в реакции с использованием реактива Грисса в модификации Метельской В. А. на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology, США) [16]. Содержание оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO) измеряли электрохимическим методом с помощью

портативной тест-системы NObreath (Bedfont Scientific, Великобритания) согласно рекомендациям производителя. Определение генетического полиморфизма NOS3 786C/T проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории РязГМУ методом аллельспецифичной ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов амплификации с использованием реагентов компании «Литех» (Россия) на амплификаторе компании «ДНК-технология» (Россия). Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенной из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, Россия). Сопоставимость распределения аллелей изучаемых полиморфизмов в исследуемой выборке по отношению к популяции определяли путем оценки соответствия равновесию Харди–Вайнберга.

Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных программ StatSoft Statistica 10. Нормальность распределения признаков оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Полученные результаты представлены в виде Me (Q25; Q75), где Me — медиана, а Q25 и Q75 — значения нижнего и верхнего квартилей соответственно. Сравнение групп проводили с использованием критериев Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты генетического исследования у наблюдаемых пациентов соответствовали равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0,08$, $p = 0,77$). Установлено, что в 12% случаев определялся генотип CC ($n = 9$), в 44% — генотип CT ($n = 31$), в 44% — генотип TT ($n = 31$). Аллель C полиморфизма NOS3 786C/T выявлен в 35% случаев ($n = 49$), аллель T — в 65% случаев ($n = 93$). Ранее нами было установлено, что у больных с сочетанием бронхиальной астмы и гипертонической болезни чаще, чем у больных с изолированной бронхиальной астмой определяется наличие T-аллеля полиморфизма NOS3 786C/T, что указывает на участие данного полиморфизма в одновременном развитии бронхиальной астмы и гипертонической болезни [17].

При оценке влияния полиморфизма NOS3 786C/T на уровень выдыхаемой фракции оксида азота, установлено, что медиана FeNO у больных носителей CC-генотипа составляла 15 (9; 23) ppb, CT-генотипа — 16 (13; 20) ppb,

TT-генотипа — 16 (9; 20) ppb. Полученные различия не были статистически значимыми ($p = 0,834$) и кроме того находились в пределах погрешности измерений тест-системы NObreath. Аналогичные результаты получены и при оценке влияния полиморфизма NOS3 786C/T на уровень FeNO в отдельных группах (табл. 1).

Анализ взаимосвязи между генотипом NOS3 786C/T и уровнем метаболитов оксида азота в крови показал, что медиана уровня метаболитов оксида азота в крови пациентов – носителей CC-генотипа составляла 69,7 (60,0; 70,4) мкмоль/л, CT-генотипа — 68,9 (57,7; 77,4) мкмоль/л, TT-генотипа — 67,7 (59,7; 79,3) мкмоль/л. Полученные различия не являются значимыми ($p = 0,843$), что соответствует полученным нами данным о непосредственной связи полиморфизма NOS3 786C/T с развитием коморбидной патологии бронхиальной астмы и гипертонической болезни [17]. Исходя из этого, целесообразным представляется проведение оценки влияния полиморфизма NOS3 786C/T на уровень метаболитов оксида азота в каждой группе в отдельности. Так у пациентов основной группы и пациентов, страдающих гипертонической болезнью, уровень метаболитов оксида азота в крови достоверно нарастает в ряду $CC < CT < TT$ ($p = 0,033$ и $p = 0,024$ соответственно) (табл. 2). Аналогичное нарастание отмечается и у больных, страдающих бронхиальной астмой, однако уровень статистической значимости несколько меньше ($p = 0,090$). В целом это позволяет сделать заключение, что полиморфизм NOS3 786C/T оказывает влияние на уровень метаболитов оксида азота в крови, при этом наличие C-аллеля полиморфизма обуславливает более низкие показатели по сравнению с T-аллелем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основной проблемой комплексного изучения влияния полиморфизмов на биохимические показатели у больных, страдающих бронхиальной астмой и гипертонической болезнью, является фенотипическая гетерогенность. Фенотипы заболевания ассоциированы с различными изменениями как биохимического, так и клинического статуса, что создает сложности для выявления генетических взаимосвязей с течением многофакторных заболеваний, к которым относятся и бронхиальная астма, и гипертоническая болезнь. Это объясняет существование лишь небольшого количества исследований, посвященных данной проблеме.

Таблица 1. Уровень выдыхаемой фракции оксида азота в зависимости от генотипа NOS3 786C/T

Генотип	БА и ГБ	БА	ГБ
CC	22 (15; 26)	11 (8; 13)	9 (9; 9)
CT	16 (13; 20)	16 (13; 20)	17 (13; 21)
TT	14 (9; 15)	20 (15; 23)	13 (8; 20)
p	0,184	0,062	0,356

Примечание: БА — бронхиальная астма, ГБ — гипертоническая болезнь.

Таблица 2. Уровень метаболитов оксида азота в крови в зависимости от генотипа NOS3 786C/T

Генотип	БА и ГБ	БА	ГБ
CC	59,5 (58,9; 60,0)	70,1 (69,7; 73,5)	43,9 (43,9; 43,9)
CT	68,1 (60,8; 72,0)	75,8 (70,1; 79,7)	55,6 (51,6; 57,7)
TT	79,3 (72,4; 84,3)	78,9 (77,0; 90,5)	60,4 (57,0; 65,4)
p	0,033	0,090	0,024

Примечание: БА — бронхиальная астма, ГБ — гипертоническая болезнь.

Так, при оценке 121 мононуклеотидного полиморфизма генов *NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, показана связь уровней FeNO и полиморфизма *NOS3* (*NOS3* (rs743507, $p = 0,004$) [18]. Однако в том же исследовании показана высокая гетерогенность полученных результатов. В российской популяции оценивалось влияние полиморфизма *NOS3* 786C/T на уровень метаболитов оксида азота в крови здоровых юношей [19]. В этой работе, так же как и в нашем исследовании, показана связь С-аллеля полиморфизма со сниженной продукцией оксида азота и развитием эндотелиальной дисфункции. Таким образом, можно сделать заключение, что полиморфизм генов *NOS1* и *NOS3* способен изменять синтез оксида азота у больных, страдающих бронхиальной астмой и гипертонической болезнью, однако требуется проведение дополнительных исследований, учитывающих фенотип заболевания. В нашем исследовании не было получено статистически значимого влияния полиморфизма *NOS3* 786C/T на уровень метаболитов оксида азота, однако выявленная тенденция к снижению показателей у лиц, носителей

С-аллеля полиморфизма, подтверждается аналогичными литературными данными, полученными у здоровых лиц. По всей видимости высокая клиническая гетерогенность течения бронхиальной астмы требует проведения более обширных исследований для определения истинной связи полиморфизма *NOS3* 786C/T у больных бронхиальной астмой.

ВЫВОДЫ

С-аллель полиморфизма *NOS3* 786C/T ассоциирован с более низким уровнем метаболитов оксида азота в крови коморбидных больных, страдающих бронхиальной астмой и гипертонической болезнью. Уровень метаболитов оксида азота возрастает в ряду генотипов СС < СТ < ТТ полиморфизма *NOS3* 786C/T в крови больных, страдающих одновременно бронхиальной астмой и гипертонической болезнью, и больных с изолированной гипертонической болезнью ($p = 0,033$ и $p = 0,024$ соответственно).

Литература

1. Белова И. В., Кулагин О. Л., Жестков А. В. Эпидемиология сочетания сердечно-сосудистых заболеваний и бронхиальной астмы у взрослых пациентов (на примере города Новокуйбышевска). Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013; 15 (3–6): 1728–30.
2. Ходюшина И. Н., Урясьев О. М. Изменение показателей гемодинамики у больных бронхиальной астмой. Российский медико-биологический вестник им. академика И. П. Павлова. 2011; (2): 22–8.
3. Козина О. В., Огородова Л. М. Образование и биологическая роль NO при аллергическом воспалении. Бюллетень сибирской медицины. 2009; 8 (3): 95–105.
4. Лямина С. В., Ребров А. П., Лямина Н. П., Сенчихин В. Н. Диагностически значимые маркеры эндотелиальной дисфункции у больных молодого возраста с артериальной гипертонией. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2007; 6 (3): 59–65.
5. Шаханов А. В., Бельских Э. С., Луняков В. А., Урясьев О. М. Клинико-патогенетическое значение определения оксида азота в крови больных бронхиальной астмой и гипертонической болезнью. Казанский медицинский журнал. 2017; 98 (4): 492–6. DOI: 10.17750/kmj2017-492.
6. Aytakin M, Aulak KS, Haserodt S, Chakravarti R, Cody J, Minai O, et al. Abnormal platelet aggregation in idiopathic pulmonary arterial hypertension: role of nitric oxide. AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology. 2012; 302 (6): L512–L520. DOI: 10.1152/ajplung.00289.2011.
7. Kumar R, Kohli S, Mishra A, et al. Interactions between the genes of vasodilatation pathways influence blood pressure and nitric oxide level in hypertension. American journal of hypertension. 2015; 28 (2): 239–247. DOI: 10.1093/ajh/hpu130.
8. Козина О. В. Метаболизм нитрозотиолов при аллергическом воспалении. Бюллетень СО РАМН. 2010; 30 (1): 109–116.
9. Ghosh S, Erzurum SC. Modulation of asthma pathogenesis by nitric oxide pathways and therapeutic opportunities. Drug discovery today. Disease mechanisms. NIH Public Access, 2012; 9 (3–4): e89–e94. DOI: 10.1016/j.ddmec.2012.10.004.
10. Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC. Nitric oxide in asthma pathophysiology. ISRN Allergy. Hindawi Publishing Corporation, 2011; 2011: 1–13. DOI: 10.5402/2011/832560.
11. Aminuddin F, Hackett T, Stefanowicz D, et al. Nitric oxide synthase polymorphisms, gene expression and lung function in chronic obstructive pulmonary disease. BMC Pulmonary Medicine. BioMed Central, 2013; 13: 64. DOI: 10.1186/1471-2466-13-64.
12. Barnes PJ. NO or no NO in asthma? Thorax BMJ Group, 1996; 51 (2): 218–220.
13. Пархоменко А. Н., Кожухов С. Н., Лутай Я. М., Мойбенко А. А., Досенко В. Е. Полиморфизм Т-786С промотора гена эндотелиальной NO-синтазы: связь с эффективностью тромболитической терапии у пациентов с острым инфарктом миокарда. Украинский медицинский журнал. 2008; 4 (66): 20–23.
14. Khaki-Khatibi F, Yaghoubi A, Ghojzadeh M, et al. Association between T-786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and level of the vessel dilation factor in patients with coronary artery disease. Molecular biology research communications. 2012; 1 (1): 1–7.
15. Шаханов А. В. Клиническое значение полиморфизма генов *NOS1* и *NOS3* и оксида азота у больных бронхиальной астмой и гипертонической болезнью [диссертация]. Рязань: 2017.
16. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2005; (6): 15.
17. Шаханов А. В., Никифоров А. А., Урясьев О. М. Полиморфизм генов синтаз оксида азота (*NOS1* 84G/A и *NOS3* 786C/T) у больных бронхиальной астмой и гипертонической болезнью. Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2017; 25 (3): 378–84. DOI: 10.23888/pavlovj20173378-390.
18. Bouzigon E, Monier F, Boussaha M, et al. Associations between Nitric Oxide Synthase Genes and Exhaled NO-Related Phenotypes according to Asthma Status. PLoS ONE. 2012; 7 (5): e36672. DOI: 10.1371/journal.pone.0036672.
19. Хромова А. В., Феликсова О. М., Куба А. А., Бебякова Н. А. Анализ влияния структурной перестройки промотора гена *NOS3* на продукцию вазоактивных эндотелиальных факторов. Журнал медико-биологических исследований. 2015; (4): 107–15.

References

1. Belova IV, Kulagin OL, Zhestkov AV. Epidemiology of combination the cardiovascular diseases and bronchial asthma at adult patients (on example of Nokokuybyshevsk city). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2013; 15 (3–6): 1728–30.
2. Khodyushina IN, Uryasev OM. *Izmenenie pokazateley gemodinamiki u bol'nykh bronkhial'noy astmoy*. Rossiyskiy mediko-biologicheskij vestnik im. akademika I.P. Pavlova. 2011; (2): 22–8.
3. Kozina OV, Ogorodova LM. Formation and biological role NO at an allergic inflammation. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2009; 8 (3): 95–105.
4. Lyamina SV, Rebrov AP, Lyamina NP, Senchikhin VN. Diagnostic markers of the endothelial dysfunction in young patients with arterial hypertension. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2007; 6 (3): 59–65.
5. Shakhanov AV, Belskikh ES, Lunyakov VA, Uryasev OM. Clinical and pathogenetic value of nitric oxide measurement in the blood of patients with bronchial asthma and essential hypertension. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 98 (4): 492–496. DOI: 10.17750/kmj2017-492.
6. Aytakin M, Aulak KS, Haserodt S, Chakravarti R, Cody J, Minai O, et al. Abnormal platelet aggregation in idiopathic pulmonary arterial hypertension: role of nitric oxide. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012; 302 (6): L512–L520. DOI: 10.1152/ajplung.00289.2011.
7. Kumar R, Kohli S, Mishra A, et al. Interactions between the genes of vasodilatation pathways influence blood pressure and nitric oxide level in hypertension. *American journal of hypertension*. 2015; 28 (2): 239–47. DOI: 10.1093/ajh/hpu130.
8. Kozina OV. Metabolism of nitrosothiols at an allergic inflammation *Byulleten' SO RAMN*. 2010; 30 (1): 109–16.
9. Ghosh S, Erzurum SC. Modulation of asthma pathogenesis by nitric oxide pathways and therapeutic opportunities. *Drug discovery today. Disease mechanisms*. NIH Public Access, 2012; 9 (3–4): e89–e94. DOI: 10.1016/j.ddmec.2012.10.004.
10. Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC. Nitric oxide in asthma pathophysiology. *ISRN Allergy*. Hindawi Publishing Corporation, 2011; 2011: 1–13. DOI: 10.5402/2011/832560.
11. Aminuddin F, Hackett T, Stefanowicz D, et al. Nitric oxide synthase polymorphisms, gene expression and lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine*. BioMed Central, 2013; 13: 64. DOI: 10.1186/1471-2466-13-64.
12. Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*. BMJ Group, 1996; 51 (2): 218–20.
13. Parkhomenko AN, Kozhukhov SN, Lutay YaM, Moybenko AA, Dosenko VE. The T-786C polymorphism of the endothelial nitric oxide gene: connection with the efficacy of thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *Ukrainskiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 4 (66): 20–3.
14. Khaki-Khatibi F, Yaghoubi A, Ghojzadeh M, et al. Association between T-786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and level of the vessel dilation factor in patients with coronary artery disease. *Molecular biology research communications*. 2012; 1 (1): 1–7.
15. Shakhanov AV. *Klinicheskoye znachenie polimorfizma genov NOS1 i NOS3 i oksida azota u bol'nykh bronkhial'noy astmoy i gipertonicheskoy bolezn'yu* [dissertation]. Ryazan: 2017.
16. Metelskaya VA, Gumanova NG. Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; (6): 15.
17. Shakhanov AV, Nikiforov AA, Uryasev OM. Polymorphism of nitric oxide synthase genes (NOS1 84G/A and NOS3 786C/T) in patients with bronchial asthma and essential hypertension. *Rossiyskiy mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I. P. Pavlova*. 2017; 25 (3): 378–84. DOI: 10.23888/pavlovj20173378-390.
18. Bouzigon E, Monier F, Boussaha M, et al. Associations between Nitric Oxide Synthase Genes and Exhaled NO-Related Phenotypes according to Asthma Status. *PLoS ONE*. 2012; 7 (5): e36672. DOI: 10.1371/journal.pone.0036672.
19. Khromova AV, Feliksova OM, Kuba AA, Bebyakova NA. The effect of structural adjustment in NOS3 gene promoter on the production of endothelium-derived vasoactive factors. *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy*. 2015; (4): 107–15.

ЭЛЕКТРОМИОСТИМУЛЯЦИЯ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ФИЗИЧЕСКОЙ ТРЕНИРОВКЕ У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ

Т. В. Кунафина¹✉, А. Г. Чучалин¹, А. С. Белевский², Н. Н. Мещерякова², Е. Н. Калманова^{1,3}, О. В. Кожевникова³

¹Кафедра госпитальной терапии, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

²Кафедра пульмонологии, факультет дополнительного профессионального образования, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³Городская клиническая больница имени Д. Д. Плетнева, Москва

Пациенты с обострением хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) не способны выполнять тренировочные упражнения в рамках программы легочной реабилитации. Альтернативой служит метод электромиостимуляции (ЭМС), поскольку его применение не вызывает усиления одышки у пациента. Целью работы была оценка эффективности краткосрочной ЭМС четырехглавой мышцы бедра на двигательную активность у пациентов с ХОБЛ. В проспективное открытое рандомизированное исследование вошли 36 пациентов, разделенные на две сопоставимые группы. Пациентам в основной группе проводили ЭМС в течение 10 дней. На 10-е сутки регистрировали и сравнивали клинико-функциональные параметры и потенциальные побочные эффекты. Между двумя группами не было отмечено существенных различий в отношении исходных характеристик. По результатам межгруппового анализа, основная группа имела статистически значимые улучшения показателей измерений, выполненных шагомером и при миографии, равных соответственно 418,5 (86,0; 815,0) против 226,7 (48,0; 660,0) ($p = 0,02$), 463,0 (122; 804) против 210,5 (64; 481) ($p = 0,0001$). Отмечалось значительное снижение баллов при оценке ХОБЛ по САТ-тесту и оценке одышки по mMRC-шкале и по шкале Borg: 22,8 (18,0; 34,0) против 28,4 (26,0; 34,0) ($p = 0,00007$), 2,7 (2,0; 4,0) против 3,1 (3,0; 4,0) ($p = 0,03$) и 6,3 (5,0; 7,0) против 7,2 (6,0; 9,0) ($p = 0,0002$) соответственно. Побочных эффектов в основной группе отмечено не было. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что краткосрочная ЭМС четырехглавой мышцы бедра улучшает двигательную активность пациентов, повышая качество жизни и способность выполнять программы легочной реабилитации в последующем, и является альтернативой физическим тренировкам у пациентов с ХОБЛ.

Ключевые слова: обострение ХОБЛ, дисфункция скелетной мускулатуры, легочная реабилитация, электромиостимуляция

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Викторовна Кунафина
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; tana_07@mail.ru

Статья получена: 19.05.2018 **Статья принята к печати:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.035

NEUROMUSCULAR ELECTRICAL STIMULATION AS AN ALTERNATIVE TO PHYSICAL EXERCISE IN PATIENTS WITH COPD

Kunafina TV¹✉, Chuchalin AG¹, Belevsky AS², Mescheryakova NN², Kalmanova EN^{1,3}, Kozhevnikova OV³

¹Department of In-Patient Care, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

²Department of Pulmonology, Faculty of Continuing Professional Education, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

³Pletnev City Clinical Hospital, Moscow

Patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are unable to do physical exercises included into standard pulmonary rehabilitation programs. Neuromuscular electrical stimulation (NMES) is a good alternative for such patients as it does not aggravate shortness of breath. The aim of this work was to assess the effect of short-term NMES of the quadriceps femoris muscle on the physical activity of patients with COPD. Our prospective open randomized study was carried out in 36 patients distributed into two groups. The main group was administered NMES for 10 days. On day 10 clinical and functional parameters, as well as adverse events, were evaluated. On admission to hospital, the groups did not differ in terms of the studied parameters. Following the treatment course, the main group significantly improved their step count and electromyography results (418.5 (86.0; 815.0) vs. 226.7 (48.0; 660.0), $p = 0.02$, and 463.0 (122; 804) vs. 210.5 (64; 481), $p = 0.0001$, respectively). The patients scored much less on the Mmrc and Borg scales and the CAT-test: 22.8 (18.0; 34.0) vs. 28.4 (26.0; 34.0), $p = 0.00007$; 2.7 (2.0; 4.0) vs. 3.1 (3.0; 4.0), $p = 0.03$; and 6.3 (5.0; 7.0) vs. 7.2 (6.0; 9.0), $p = 0.0002$, respectively. No adverse events were registered in the main group. Based on the obtained results, we conclude that short-term NMES of the quadriceps femoris muscle improves physical activity, the quality of life and ability to do physical exercise in patients with COPD providing them with a good alternative to standard rehabilitation programs.

Keywords: COPD exacerbation, skeletal muscle dysfunction, pulmonary rehabilitation, neuromuscular electrical stimulation

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana V. Kunafina
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; tana_07@mail.ru

Received: 19.05.2018 **Accepted:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.035

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире [1, 2]. Естественное течение заболевания отмечено обострениями, которые влияют на прогноз у таких пациентов [2]. Становится все более очевидным, что ХОБЛ присущ ряд системных проявлений, особенно при тяжелом протекании заболевания, и что эти проявления оказывают выраженное влияние на выживаемость пациентов и развитие сопутствующих заболеваний. У пациентов с тяжелой формой ХОБЛ часто отмечается кахексия. Возможна потеря мышечной массы и слабость мышц в результате активации апоптоза и/или бездействия мышц [3, 4]. При обострении заболевания отмечается увеличение дыхательной недостаточности, а также возрастает потребность в системных глюкокортикостероидах, при этом усугубляется и без того плохое состояние скелетной мускулатуры. Это, в свою очередь, приводит к утомлению дыхательной мускулатуры с одной стороны, и к ограничению двигательной активности — с другой. При уменьшении двигательной активности отмечается гиподинамия, приводящая к дистрофии, а в последующем — к атрофии скелетных мышц (рис. 1). Одной из самых крупных мышц, участвующих в двигательной активности является четырехглавая мышца бедра. Слабость и атрофия именно этой мышцы приводят к худшим прогнозам и повышению смертности у пациентов с ХОБЛ [4].

Из-за развивающейся слабости и атрофии скелетной и дыхательной мускулатуры у больных с тяжелой формой ХОБЛ, в терапии таких пациентов отводится большое значение физической тренировке [5, 6]. Физические тренировки — основной компонент легочной реабилитации. Продолжительность тренировок может достигать 4–12 недель, оптимальным сроком считают 6–8 недель [6].

Легочная реабилитация на протяжении не менее 4 недель приводит к улучшению клинически и статистически значимых показателей качества жизни, в том числе уменьшению одышки, усталости, улучшению эмоционального статуса [7]. Однако пациенты с тяжелой и крайне тяжелой степенью ХОБЛ не способны к выполнению данных методов реабилитации из-за выраженной дыхательной недостаточности, общей слабости, низкой готовности к легочной реабилитации. В качестве альтернативы и «мостиком» к физическим тренировкам является электромиостимуляция [7]. Показана эффективность электромиостимуляции четырехглавой мышцы бедра, проводившейся на протяжении не менее 4 недель, в качестве оценки которой использовали шкалы по определению одышки и опросник Святого Георгия (St. George's Respiratory Questionnaire) [8].

Целью нашего исследования была оценка эффективности краткосрочного воздействия электромиостимуляции на четырехглавую мышцу бедра с применением шагомера и метода поверхностной электромиографии у пациентов с тяжелым течением и обострением ХОБЛ, не способных к выполнению стандартных программ легочной реабилитации.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с сентября 2016 г. по февраль 2018 г. в пульмонологическом отделении университетской клиники проводили открытое проспективное когортное рандомизированное сравнительное исследование. Обследовали 56 пациентов с обострением ХОБЛ, сопровождающимся дыхательной недостаточностью. Из них только у 36 пациентов была зафиксирована дисфункция четырехглавой мышцы бедра. Пациенты были разделены на две группы. В основной группе ($n = 18$) проводили

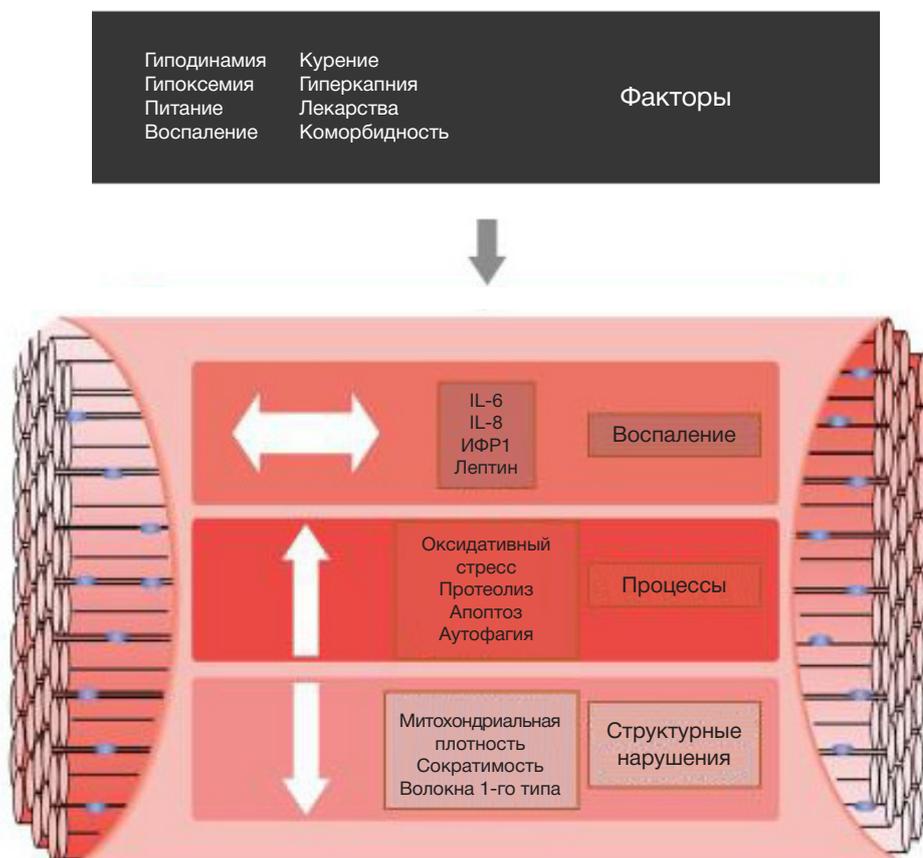


Рис. 1. Факторы, влияющие на повреждение мышечного волокна (По данным: Abdulai R. M. et al., 2017 [15])

краткосрочную электромиостимуляцию с помощью аппарата Comrex (Comrex, Франция). Результаты сопоставляли попарно с контрольной группой ($n = 18$). Критериями включения пациентов были обострение ХОБЛ, определяемое клинически по наличию не менее двух признаков и симптомов: нарастанию одышки, усилению кашля, увеличению количества или гноистости мокроты; признаки дыхательной недостаточности, сопровождающиеся слабостью, ограничением физической активности, подтвержденным результатами использования шагомера и метода электромиографии; дисфункция четырехглавой мышцы бедра (амплитуда при максимальном мышечном сокращении по данным поверхностной миографии < 600 мкВ). Критерии исключения из исследования: гипертермия до фебрильных и субфебрильных значений температуры; отсутствие изменений на электромиографии; наличие пневмонии; психические нарушения, препятствующие установлению продуктивного контакта между врачом и пациентом; абсолютные противопоказания к применению аппарата, т. е. наличие кардиостимулятора, эпилепсия, серьезные нарушения артериального кровоснабжения нижних конечностей, наличие у пациента брюшной или паховой грыжи. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом (протокол №154 от 11.04.2016 г.). От всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Пациентов сопоставляли по возрасту, данным опросника mMRC (опросник Британского медицинского исследовательского совета для оценки тяжести одышки), САТ-тесту оценки ХОБЛ, спирометрическим параметрам (объему форсированного выдоха за 1 с (ОФВ₁), соотношению ОФВ₁/ФЖЕЛ), параметрам газового анализа артериальной крови (ГАК), а именно рН, парциальному давлению кислорода в артериальной крови (PaO₂), парциальному давлению углекислого газа в артериальной крови (PaCO₂), показателям электромиографии на момент поступления. Все пациенты получали стандартное лечение, назначаемое при обострении ХОБЛ в соответствии с международными рекомендациями (GOLD, 2017): ингаляционные бронхолитики, системные глюкокортикостероиды (преднизолон 20–40 мг в день) и эмпирическую антибактериальную терапию в соответствии с местной бактериальной устойчивостью и сопутствующими заболеваниями. Клинические параметры, показатели шагомера, электромиографии, шкалы одышки по Borg, mMRC, САТ, потенциальные побочные эффекты оценивали по истечении 10 дней и затем сравнивали между двумя группами.

Электромиография

Всем больным из основной группы и группы контроля проводили поверхностную электромиографию (ЭМГ) — метод клинической электромиографии для исследования накожной суммарной биоэлектрической активности мышц в покое и при различных режимах напряжения согласно инструкции производителя. Электромиографию проводили с помощью многофункционального аппарата Nemus 1 (EB Neuro; Италия) с возможностью проведения ЭМГ и вызванных потенциалов.

Забор крови для ГАК

Забор крови производили с помощью автоматически наполняющихся шприцев (PICO70® Radiometer; Дания) из лучевой артерии не ранее чем через 15 мин после

прекращения оксигенотерапии и анализировали с помощью анализатора крови RAPIDLab® 1200 Systems (Siemens; Германия) согласно инструкции производителя.

Шагомер

Физическую активность оценивали с помощью шагомера Torneo A-946BTRN (Compus pro; Китай). Аппарат для оценки количества шагов располагался на поясе одежды в течение 6 ч бодрствования.

Электромиостимуляция

Пациентам основной группы проводили электромиостимуляцию. Во время проведения процедуры пациент находился в положении сидя, либо в положении лежа на спине с валиком под коленями (пациенты с крайне тяжелой формой ХОБЛ). (+)-Электрод накладывали на кожу бедра на уровне моторной точки мышцы, где происходило наилучшее сокращение мышцы в условиях максимального комфорта. (–)-Электрод накладывали дистальнее на 10 см. Использовали чередование программ *Sport| resistance* (спорт, сопротивление), время работы аппарата 32 мин, и *Aesthetic, firing* (эстетика, укрепление), время работы аппарата 22 мин, через день. Интенсивность подбирали индивидуально по переносимости и ответному мышечному сокращению, в диапазоне от 10 до 35 мА.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Staistica 10 StatSoft. Использовали непараметрические методы описательной статистики: рассчитывали медианы (Me), верхний (Q₃) и нижний (Q₁) квартили. Данные представляли в виде (Me (Q₁; Q₃)). Сравнение двух независимых групп количественных признаков проводили с применением U-теста Манна–Уитни. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные характеристики больных

При поступлении пациенты обеих групп имели одинаковые основные характеристики, спирометрические данные и показатели миографии. Сравнение значений параметров ГАК (рН, PaO₂, PaCO₂) тоже не выявило существенной разницы (табл. 1).

Влияние электромиостимуляции на качество жизни

При анализе влияния ЭМС на качество жизни у пациентов основной группы выявлено улучшение показателей по САТ-тесту, шкале mMRC и шкале Borg. При этом в группе контроля значимого улучшения не выявлено (табл. 2).

Влияние электромиостимуляции на клинические показатели

Анализ влияния ЭМС на клинические параметры показал, что в обеих группах (основной и группе сравнения) заметно улучшились значения показателя SpO₂, при этом на 10-й день в основной группе и группе сравнения достоверной разницы между значениями SpO₂ не было установлено (табл. 2).

Влияние электромиостимуляции на двигательную активность и состояние четырехглавой мышцы бедра

Внутригрупповой анализ показателей миографии и результатов измерений, сделанных шагомером, у пациентов основной группы показал их значительное улучшение. По результатам межгруппового анализа статистически значимое улучшение этих показателей наблюдалось у пациентов основной группы (рис. 2 и рис. 3 соответственно) на 10-й день (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реабилитация пациентов с ХОБЛ имеет большое значение при комплексной терапии. Именно физическим тренировкам отводится при этом немаловажное значение. Эффективность легочной реабилитации у пациентов с ХОБЛ имеет большой уровень доказательности [2]. Однако встает вопрос о том, как помочь тем пациентам, которые не способны к выполнению стандартных программ легочной реабилитации. По литературным данным, альтернативой физическим упражнениям может стать метод электромиостимуляции.

К настоящему времени проведено небольшое число клинических исследований, посвященных изучению эффективности электромиостимуляции четырехглавой мышцы бедра как одного из вариантов легочной реабилитации пациентов с тяжелой и крайне тяжелой формами ХОБЛ [7–10]. В представленных работах электромиостимуляция проводилась в достаточно длительные

сроки, около 4–6 недель, и имела положительный эффект [11–14]. В качестве оценки использовали преимущественно субъективные методы, такие как, шестиминутный тест, опросник святого Георгия [8]. Результаты нашего исследования показывают, что электростимуляция четырехглавой мышцы бедра в короткие сроки тоже приводит к улучшению функции указанной мышцы. Наиболее достоверным критерием оценки эффективности электростимуляции являются результаты электромиографии. В нашей работе при оценке влияния электростимуляции на насыщение гемоглобина капиллярной крови кислородом отмечено повышение SpO_2 , как в основной группе, так и в группе сравнения, что, вероятнее всего, обусловлено параллельно проводимой терапией у данных пациентов: приемом бронхолитических препаратов, кислородотерапией, у отдельных пациентов респираторной поддержкой. При оценке влияния электростимуляции на субъективное состояние пациента, а именно при оценке результатов измерения одышки по шкале Borg во время физической нагрузки и шкале mMRC, показано достоверное улучшение самочувствия у пациентов основной группы, вероятно, за счет уменьшения одышки на фоне улучшения функциональных свойств скелетной мускулатуры. Кроме того, прослеживается достоверное уменьшение количества баллов по вопроснику CAT, что связано с повышением двигательной активности пациента и улучшением качества жизни [7].

В нашем исследовании все субъективные изменения подтверждаются достоверным улучшением показателей миографии и результатов измерений, сделанных шагомером, использовавшихся нами в качестве оценки эффективности.

Таблица 1. Основные характеристики групп

Показатель	Основная группа (n = 18)	Группа контроля (n = 18)	p
Возраст, лет	66 (53; 77)*	69,6 (53; 80)	> 0,05
Пол, м/ж	16/2	15/3	> 0,05
Индекс массы тела, кг/м ²	24,0 (18,3; 31,2)	22,9 (18,1; 27,6)	> 0,05
Индекс курящего человека (для курящих пациентов), пачка/лет	45,9 (30; 60)	43,6 (20; 60)	> 0,05
CAT-тест, баллы	28,1 (21,0; 39)	30,0 (27,0; 36,0)	> 0,05
Одышка по шкале mMRC, баллы	3,4 (3; 4)	3,5 (3; 4)	> 0,05
Одышка по шкале Borg, баллы	8,7 (8,0; 10,0)	8,7 (8,0; 10,0)	> 0,05
ОФВ ₁ , %	31,3 (20; 59)	32,8 (13,0; 56,0)	> 0,05
pO ₂ , мм рт. ст.	58,69 (33,5; 72,4)	59,6 (46,3; 76,9)	> 0,05
pCO ₂ , мм рт. ст.	45,63 (28,6; 65,8)	45,6 (26,1; 74,3)	> 0,05
pH	7,41 (7,36; 7,47)	7,40 (7,38; 7,44)	> 0,05
Поверхностная миография четырехглавой мышцы бедра, мкВ	204,06 (55,1; 435)	194,3 (58; 443)	> 0,05
Шагомер, кол-во шагов	295 (38,0; 700,0)	220 (45,0; 651)	> 0,05

Примечание: * — все данные представлены в виде Me (Q₁; Q₃); p — достоверность различий между двумя группами.

Таблица 2. Сравнение эффективности ЭМС в основной группе и группе сравнения

Параметры	Основная группа (n = 18)	Группа контроля (n = 18)	p
Качество жизни и SpO ₂			
CAT-тест, баллы	22,8 (18,0; 34,0)*	28,44 (26,0; 34,0)	0,00007
Одышка по шкале mMRC, баллы	2,78 (2,0; 4,0)	3,17 (3,0; 4,0)	0,03
Одышка по шкале Borg, баллы	6,28 (5,0; 7,0)	7,22 (6,0; 9,0)	0,0002
Сатурация кислородом гемоглобина капиллярной крови, %	93,7 (88,0; 96,0)	93,7 (90,0; 96,0)	0,4
Двигательная активность и состояние четырехглавой мышцы бедра			
Шагомер, кол-во шагов	418 (86,0; 815,0)	226 (48,0; 660,0)	0,0001
Миография, мкВ	463,0 (122,0; 804,0)	210,5 (64,0; 481,0)	0,02

Примечание: * — все данные представлены в виде Me (Q₁; Q₃); p — достоверность различий между двумя группами.

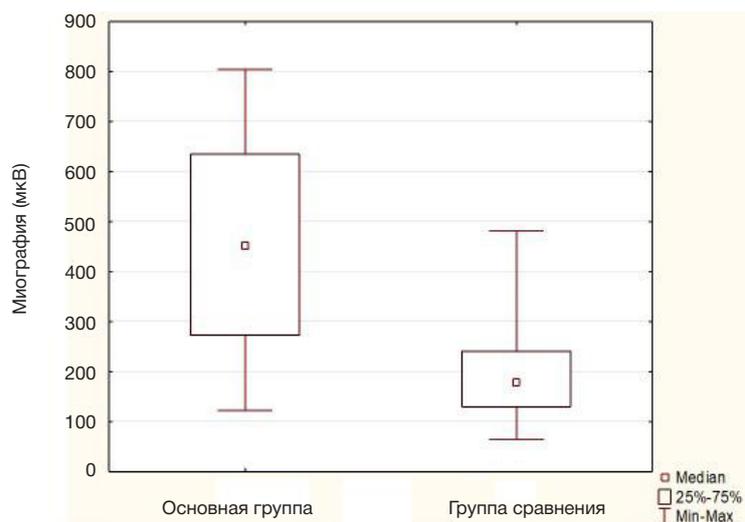


Рис. 2. Показатели миографии на 10 сутки (сравнение двух независимых групп количественных признаков с применением U-теста Манна–Уитни)

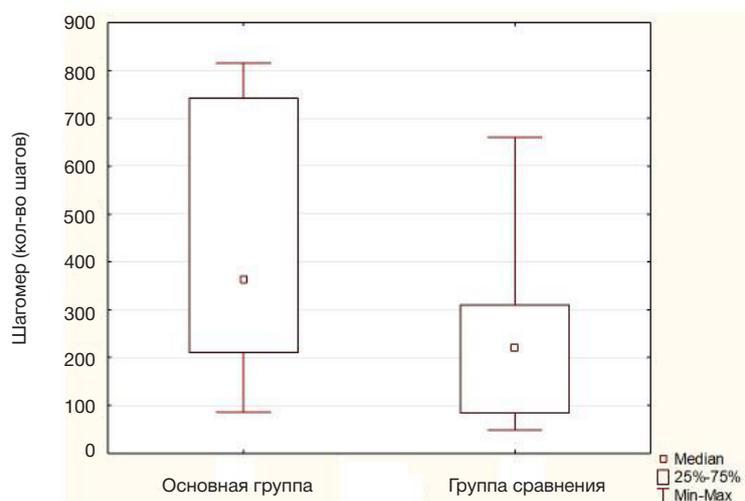


Рис. 3. Показатели шагомера на 10 сутки (сравнение двух независимых групп количественных признаков с применением U-теста Манна–Уитни)

ВЫВОДЫ

По результатам работы можно сделать вывод, что электромиостимуляция четырехглавой мышцы бедра может стать эффективной альтернативой тренировкам

у больных с тяжелым обострением ХОБЛ. Данный метод можно использовать в качестве одного из компонентов программы легочной реабилитации у пациентов с ХОБЛ, не способных выполнять физические упражнения.

Литература

1. Чучалин А. Г., Авдеев С. Н., Айсанов З. Р., Белевский А. С., Лещенко И. В., Мещерякова Н. Н., Овчаренко С. И., Шмелев Е. И. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких. Пульмонология. 2014; (3): 15–54.
2. Deckamer V, Vogelmeier C. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. 2015: 1–44.
3. Авдеев С. Системные эффекты у больных ХОБЛ. Врач. 2006; 12: 3–8.
4. Перцева Т. А., Санина Н. А. Выраженность системных воспалительных реакций у больных хронической обструктивной болезнью легких. Пульмонология. 2013; (1): 38–41.
5. Barreiro E, Gea J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. Chron Respir Dis. 2016; 13 (3): 297–311.
6. Мухарлямов Ф. Ю., Сычева М. Г., Рассулова М. А., Разумов А. Н. Пульмонологическая реабилитация: современные программы и перспективы. Пульмонология. 2013; 6: 99–105.
7. Ont Health Technol Assess Ser. Pulmonary Rehabilitation for Patients With Chronic Pulmonary Disease (COPD): an Evidence-Based Analysis.. 2012; 12 (6): 1–75
8. Мещерякова Н. Н., Белевский А. С., Черняк А. В., Лебедин Ю. С. Влияние методов легочной реабилитации на маркеры системного воспаления и уровень тестостерона в крови у больных хронической обструктивной болезнью легких. Пульмонология. 2011; 2: 81–86.
9. Rong-chang Chen, Xiao-ying Li. Effectiveness of neuromuscular electrical stimulation for the rehabilitation of moderate-to-severe COPD: a meta-analysis. Chron Respir Dis. 2016; 13 (3): 297–311.
10. Abdellaoui A, Préfaut C, Gouzi F, Couillard A, Coisy-Quivy M,

- Hugon G, et al. Skeletal muscle effects of electrostimulation after COPD exacerbation: a pilot study. *Europ Resp J*. 2011; 38: 781–8.
11. Сандухадзе Б. Р. Возможности кардиосинхронизированной электромиостимуляции в лечении хронической сердечной недостаточности у больных на фоне ИБС [диссертация]. М.: 2009.
 12. Barreiro E, Gea J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*. 2016; 13 (3): 297–311.
 13. Windholz T, Swanson T, Vanderbyl BL, Jagoe RT. The feasibility and acceptability of neuromuscular electrical stimulation to improve exercise performance in patients with advanced cancer: a pilot study. *BMC Palliat Care*. 2014; 13: 23.
 14. Fischer A, Spiegl M, Altmann K. Muscle mass, strength and functional outcomes in critically ill patients after cardiothoracic surgery: does neuromuscular electrical stimulation help? The Catastim 2 randomized controlled trial. *Crit Care*. 2015; 20: 30.
 15. Abdulai RM, Jensen TJ, Patel NR, Polkey MI, Jansson P, Celli BR, Rennard SI. Deterioration of Limb Muscle Function during Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Resp Crit Care Medicine*. 2017; 197 (4): 433–49.

References

1. Chuchalin AG, Avdeev SN, Ajsanov ZR, Belevskij AS, Leshchenko IV, Meshherjakova NN, Ovcharenko SI, Shmelev EI. Federal'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniju hronicheskoy obstruktivnoj bolezni legkih. *Pul'monologija*. 2014; (3): 15–54.
2. Deckamer V, Vogelmeier C. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*. 2015: 1–44.
3. Avdeev S. Sistemnye jeffekty u bol'nyh HOBL. *Vrach*. 2006; 12: 3–8.
4. Perceva TA, Sanina NA. Vyrashennost' sistemnyh vospalitel'nyh reakcij u bol'nyh hronicheskoy obstruktivnoj bolezni'ju legkih. *Pul'monologija*. 2013; (1): 38–41.
5. Barreiro E, Gea J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*. 2016; 13 (3): 297–311.
6. Muharlamov FJu, Sycheva MG, Rassulova MA, Razumov AN. Pul'monologicheskaja reabilitacija: sovremennye programmy i perspektivy. *Pul'monologija*. 2013; 6: 99–105.
7. Ont Health Technol Assess Ser. Pulmonary Rehabilitation for Patients With Chronic Pulmonary Disease (COPD): an Evidence-Based Analysis.. 2012; 12 (6): 1–75
8. Meshherjakova NN, Belevskij AS, Chernjak AV, Lebedin JuS. Vlijanie metodov legochnoj reabilitacii na markery sistemnogo vospalenija i uroven' testosterona v krvi u bol'nyh hronicheskoy obstruktivnoj bolezni'ju legkih. *Pul'monologija*. 2011; 2: 81–86.
9. Rong-chang Chen, Xiao-ying Li. Effectiveness of neuromuscular electrical stimulation for the rehabilitation of moderate-to-severe COPD: a meta-analysis. *Chron Respir Dis*. 2016; 13 (3): 297–311.
10. Abdellaoui A, Préfaut C, Gouzi F, Couillard A, Coisy-Quivy M, Hugon G, et al. Skeletal muscle effects of electrostimulation after COPD exacerbation: a pilot study. *Europ Resp J*. 2011; 38: 781–8.
11. Sanduhadze BR. Vozmozhnosti kardiosinhronizirovannoj jelektromiostimuljacii v lechenii hronicheskoy serdečnoj nedostatočnosti u bol'nyh na fone IBS [dissertacija]. М.: 2009.
12. Barreiro E, Gea J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*. 2016; 13 (3): 297–311.
13. Windholz T, Swanson T, Vanderbyl BL, Jagoe RT. The feasibility and acceptability of neuromuscular electrical stimulation to improve exercise performance in patients with advanced cancer: a pilot study. *BMC Palliat Care*. 2014; 13: 23.
14. Fischer A, Spiegl M, Altmann K. Muscle mass, strength and functional outcomes in critically ill patients after cardiothoracic surgery: does neuromuscular electrical stimulation help? The Catastim 2 randomized controlled trial. *Crit Care*. 2015; 20: 30.
15. Abdulai RM, Jensen TJ, Patel NR, Polkey MI, Jansson P, Celli BR, Rennard SI. Deterioration of Limb Muscle Function during Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Resp Crit Care Medicine*. 2017; 197 (4): 433–49.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ Фолликулов Щитовидной ЖЕЛЕЗЫ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ГИПОТИРЕОЗЕ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СРЕДНЕИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

И. В. Смелова¹✉, Е. С. Головнева²

¹ Многопрофильный центр лазерной медицины, Челябинск

² Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск

Проблема гипотиреоза в последнее время не теряет своей актуальности. При лечении тиреопатий успешно используется лазерное облучение щитовидной железы. Эффективность лазерного воздействия зависит от применяемой дозы излучения. Изменение формы и объема структурно-функциональных единиц органа (тиреоцитов и фолликулов) является дозозависимым процессом и отражает их функциональное состояние, влияющее на синтез, накопление и секрецию тиреоидных гормонов. Целью исследования было изучение влияния инфракрасного лазерного облучения средней интенсивности при суммарной плотности дозы с поверхности кожи 112 Дж/см² и 450 Дж/см² на морфофункциональное состояние тиреоцитов и фолликулов щитовидной железы в норме и при гипотиреозе. Эксперимент проведен на лабораторных крысах самцах. Показано, что лазерное воздействие изменяет состояние тиреоцитов и фолликулов как интактной щитовидной железы, так и при гипотиреозе. При сравнении эффектов двух изучаемых режимов лазерного воздействия на щитовидную железу с экспериментальным гипотиреозом повышение функции и регенеративных процессов железы отмечено при плотности дозы с поверхности кожи 112 Дж/см², и торможение при плотности дозы 450 Дж/см². Полученные результаты могут быть использованы для коррекции гипотиреоза в эксперименте.

Ключевые слова: тиреоцит, фолликул, ядерно-клеточное отношение, индекс накопления коллоида, лазерное излучение, щитовидная железа, гипотиреоз

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Викторовна Смелова
ул. Потемкина, д. 14, кв. 65, г. Челябинск, 454081; spiral.siv@mail.ru

Статья получена: 15.02.2018 **Статья принята к печати:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.028

THE STUDY OF MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE THYROID FOLLICLES OF HEALTHY RATS AND RATS WITH EXPERIMENTALLY INDUCED HYPOTHYROIDISM FOLLOWING EXPOSURE TO MEDIUM-POWER LASER RADIATION

Smelova IV¹✉, Golovneva ES²

¹ Multidisciplinary Center for Laser Medicine, Chelyabinsk

² South Ural State Medical University of Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk

Hypothyroidism remains a pressing concern. Laser irradiation is a widely used treatment option for patients with thyroid pathologies. Its efficacy depends on the applied dose. Changes in the form and volume of the structural components of the glands, such as thyrocytes and follicles, are dose-dependent and signal their functional state, which affects production, accumulation and secretion of thyroid hormones. The aim of our study was to explore the effect of infrared medium-power laser with total energy densities of 112 J/cm² and 450 J/cm² on the morphology and function of the thyroid and its follicles in health and hypothyroidism. The experiment was conducted in male rats. It was demonstrated that laser radiation affects the morphological state of thyrocytes and follicles of both intact animals and animals with experimentally induced hypothyroidism. Comparison of two laser regimens revealed that 112 J/cm² energies stimulated tissue regeneration and thyroid activity in general, whereas 450 J/cm² energies suppressed those processes. Our findings can be used to study hypothyroidism treatment options in the experimental setting.

Keywords: thyrocyte, follicle, nucleus/cell ratio, colloid accumulation index, laser, thyroid, hypothyroidism

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Smelova
Potemkina 14, kv. 65, Chelyabinsk, 454081; spiral.siv@mail.ru

Received: 15.02.2018 **Accepted:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.028

Гипотиреоз — одно из наиболее распространенных эндокринных заболеваний. Взаимосвязь патологии щитовидной железы с нарушением функций различных органов и систем, а также несовершенство методов решения проблемы объясняет интерес врачей различных специальностей к данному вопросу [1]. Ведется активный поиск новых способов лечения, в том числе с использованием лазерных технологий. Приоритетное

направление в коррекции субклинического гипотиреоза имеет низкоинтенсивная лазеротерапия [2, 3]. Наряду с этим разрабатываются методики на основе лазерного воздействия повышенной мощности для достижения терапевтических доз на глубине ткани [4, 5].

Щитовидная железа доступна прямому лазерному воздействию с поверхности тела. Лазерное облучение может изменять ее функцию, способствовать повышению

выработки гормонов, улучшать микроциркуляцию и влиять на репарацию тканей органа, что успешно применяется при лечении гипотиреоза и аутоиммунных тиреоидитов [6–10]. Существует мнение, что воздействие фотонов света на строму железы способствует ее структурной перестройке [10], вызывая изменение высоты эпителия, формы и объема фолликулов.

До настоящего времени остается неизученным влияние плотности дозы среднеинтенсивного лазерного воздействия на функциональную активность щитовидной железы у животных в норме и животных с экспериментальным гипотиреозом.

Целью работы было изучение воздействия среднеинтенсивного инфракрасного лазерного облучения щитовидной железы на морфофункциональное состояние тиреоидного эпителия и фолликулов в норме и при экспериментальном гипотиреозе в зависимости от плотности дозы лазерной энергии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе Южно-Уральского государственного медицинского университета и Многопрофильного центра лазерной медицины города Челябинска с 2016 по 2018 годы. Эксперимент выполнен на 78 беспородных половозрелых лабораторных крысах самцах, весом 200–220 г, содержащихся в условиях вивария, в клетках по 2–3 особи *ad libitum*, на сбалансированном рационе и обычном световом режиме (день–ночь). Выбор особей-самцов обусловлен отсутствием у них гормональных колебаний, эструса. Опыты проведены с соблюдением норм и правил гуманного обращения с животными; в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», регламентированных в приложении к приказу МЗ СССР №755 от 12.09.77, и строгом соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с изменениями от 1975, 1983 и 1989 годов.

Животные были разделены на 6 групп:

- 1) интактные животные;
- 2) интактные животные, суммарная плотность дозы лазерного воздействия на щитовидную железу 112 Дж/см² (0,5 Вт, 45 с);
- 3) интактные животные, суммарная плотность дозы лазерного воздействия на щитовидную железу 450 Дж/см² (1,5 Вт, 60 с);
- 4) животные с экспериментальным гипотиреозом;
- 5) животные с экспериментальным гипотиреозом, суммарная плотность дозы лазерного воздействия на щитовидную железу 112 Дж/см² (0,5 Вт, 45 с);
- 6) животные с экспериментальным гипотиреозом; суммарная плотность дозы лазерного воздействия на щитовидную железу 450 Дж/см² (1,5 Вт, 60 с).

Гипотиреоз моделировали ежедневным пероральным введением 0,5 мл тиамазола в 0,9% изотоническом растворе NaCl, приготовленного из препарата «Мерказолил» («Акрихин», Россия) *ex tempore*, в дозе 25 мг/кг с помощью специального зонда в течение 21 суток [11]. Животным контрольной группы ежедневно перорально вводили 0,5 мл 0,9% изотонического раствора в течение 21 суток. Оценку гипотиреоза проводили по клиническим признакам (изменению массы тела, аппетита, состоянию шерсти, температуры), а также морфологическому состоянию щитовидной железы и уровню тиреоидных гормонов сыворотки.

Лазерное воздействие осуществляли аппаратом «ИРЭ-Полюс» (НПО «ИРЭ-Полюс», Россия), длина волны рабочего излучения 970 нм, в непрерывном режиме в течение пяти дней, начиная со следующего дня после окончания моделирования гипотиреоза (22-е сутки).

Выведение животных из эксперимента осуществляли под эфирным наркозом путем цервикальной дислокации через 1, 7, 30 суток после окончания облучения.

Материал для морфологического исследования забирали в 10% раствор нейтрального формалина, затем готовили стандартные гистологические парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином — эозином (рН = 2,0). Микроскопические исследования проводили на микроскопе «DMRXA» (Leica, Германия) при увеличении в 400 раз. Результаты анализировали с помощью компьютерной программы «ImageScope M», 2006 г. (Германия), совмещенной с микроскопом. Морфометрический анализ гистологических срезов заключался в определении высоты тиреоидного эпителия, минимального и максимального диаметра, площади фолликулов. Измерение высоты эпителия и размера фолликулов проводили по 10 полям зрения в каждом препарате. Для оценки функциональной активности щитовидной железы вычисляли показатель Брауна (индекса накопления коллоида) как отношение внутреннего диаметра фолликула к удвоенной высоте фолликулярного эпителия и ядерно-клеточный показатель — отношение площади ядра тиреоцита к площади клетки, выраженное в процентах.

Полученные данные анализировали при помощи компьютерных программ Microsoft Office Excel (2007 г.), SPSS Statistics 20 (2014 г.) непараметрическими методами с вычислением медианы, верхнего и нижнего квартилей. Для оценки значимости различий между группами сравнения использовали критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки $p < 0,05$ различия в группах считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На анализируемых гистологических препаратах щитовидная железа животных контрольной группы имела дольчатое строение. Соединительнотканые перегородки между дольками хорошо выражены. Округлые и овальные фолликулы средних размеров, расположены компактно. Тиреоциты кубической формы с четкими контурами образуют один слой фолликулярного эпителия. Ядра клеток эпителия шаровидные, лежат у основания. Просвет фолликулов равномерно заполнен коллоидом розово-фиолетового цвета, нередко пенистым по краям (рис. 1).

После моделирования гипотиреоза дольчатое строение щитовидной железы сохранилось. Объем стромы увеличился. Соединительнотканые перегородки между дольками стали более рыхлыми с участками очагового венозно-капиллярного полнокровия, эритростазами. Фолликулы уменьшились в размере, коллоид светлый, часто без окраски. Тиреоциты в некоторых полях зрения увеличены в объеме, имеют «пенистую» вакуолизированную бледноокрашенную цитоплазму. Имеются клетки с явлениями некролиза, ядра у них бледноокрашенные, а часть клеток с полной утратой ядер (рис. 2).

При анализе данных, полученных в нашем исследовании, мы отмечаем, что медикаментозное моделирование гипотиреоза способствует изменению стромально-паренхиматозных характеристик щитовидной железы. Морфологически объем клетки увеличился вследствие

тяжелой гидропической и вакуольной дистрофии. Цитоплазма этих клеток слабо воспринимала кислые красители и имела бледно-розовое окрашивание, в то время как в интактном контроле цитоплазма была однородной, гомогенной, оптически плотной, хорошо воспринимала кислые красители. В щитовидной железе с моделью гипотиреоза мы находили участки ткани с тяжелой дистрофией, вплоть до некробиозов и некрозов. Увеличение объема органа в целом происходило за счет отека. Показатель ядерно-клеточного отношения уменьшался преимущественно за счет увеличения площади цитоплазмы тиреоцитов, изменение площади ядер было менее существенным.

При сравнении этих групп отмечалось статистически значимое изменение анализируемых структурных образований (табл. 1). Высота тиреоидного эпителия уменьшалась на ранних сроках (1 и 7 суток) и повышалась через 30 суток, а максимальный, минимальный диаметр и площадь фолликулов уменьшались через 7 и 30 суток. Показатели ядерно-клеточного отношения были меньше на всех

сроках наблюдения, а индекс Брауна больше через 1 сутки и меньше через 30 суток по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

После лазерного облучения щитовидной железы интактных животных при суммарной плотности дозы с поверхности кожи, равной 112 Дж/см^2 , изменения в препаратах по всем срокам наблюдения были однотипные, различие проявлялось в сосудистой реакции. Отмечалось полнокровие сосудов, наиболее выраженное паретическое, через сутки. Структура щитовидной железы сохранялась. Некоторые фолликулы были увеличены в размере, коллоид ярко-розовый, компактный. Высота тиреоидного эпителия достоверно увеличилась, а диаметры и площадь фолликулов уменьшились во всех группах (табл. 1). Ядерно-клеточное отношение увеличилось, а индекс Брауна уменьшился на всех сроках наблюдения (табл. 2).

Воздействие лазером на щитовидную железу интактных животных при суммарной плотности дозы с поверхности кожи, равной 450 Дж/см^2 , вызывало выраженное

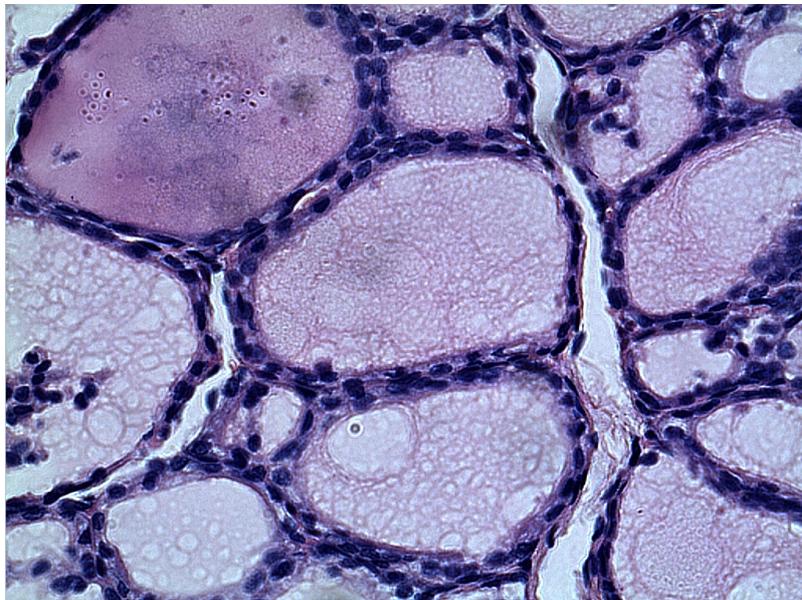


Рис. 1. Интактная щитовидная железа. Окраска: гематоксилин-эозин; ув. $\times 400$

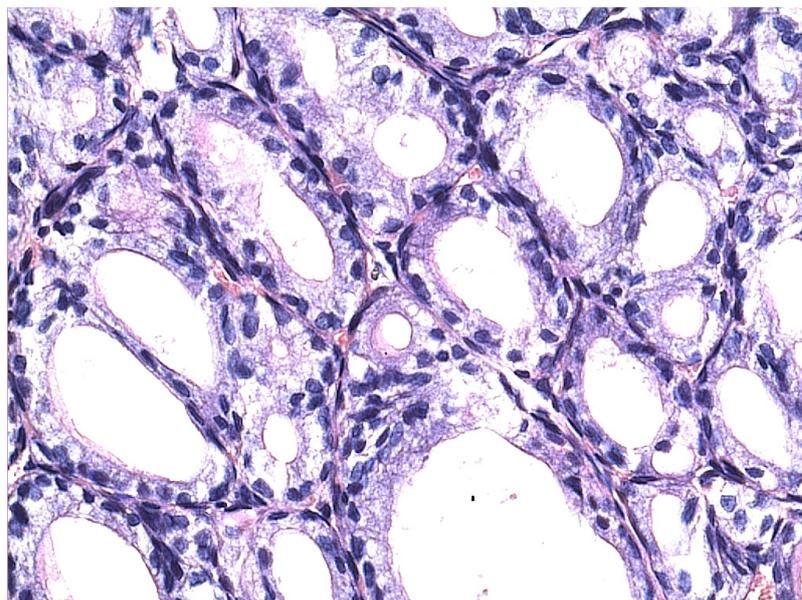


Рис. 2. Гипотиреоз. Окраска: гематоксилин-эозин; ув. $\times 400$

паретическое полнокровие органа на ранних сроках (1 и 7 сутки). После воздействия цитоплазма тиреоцитов была несколько набухшей, мелкозернистой. Группы клеток имели форму, близкую к цилиндрической, кроме того мы наблюдали тиреоциты кубической формы, розовый мелкозернистый коллоид, однородные фолликулы. Через 30 суток после облучения структура железы была сопоставима с группой сравнения, но коллоид оставался мелкозернистым.

Статистически значимое повышение высоты тиреоидного эпителия отмечали через 1 и 30 суток. Увеличивались минимальный, максимальный диаметр и площадь фолликулов

на ранних сроках наблюдения (1 и 7 сутки) с последующим уменьшением значений ниже исходного уровня к концу 30 суток. Индекс Брауна достоверно повышался через 7 суток и уменьшался через 30 суток.

После окончания лазерного воздействия в дозе 112 Дж/см² на щитовидную железу животных с моделью гипотиреоза сохранилось дольчатое строение органа с хорошо развитой стромой, большим количеством кровеносных сосудов (рис. 3). Фолликулы были средними и крупными при заборе материала через 1 сутки и преимущественно мелкими через 7 и 30 суток. Фолликулярный эпителий был кубической и призматической формы

Таблица 1. Сравнительная характеристика групп животных по высоте эпителия, диаметру и площади фолликулов

Группы	Высота эпителия (мкм)	Максимальный диаметр фолликула (мкм)	Минимальный диаметр фолликула (мкм)	Площадь фолликула (мкм ²)
Группа 1: интактные животные	5,41 (4,31; 6,06) ^{#1}	67,25 (51,83; 85,20) ^{#1}	39,85 (28,00; 65,23) ^{#1}	1936,55 (1162,15; 4469,65) ^{#1}
Группа 2: интактные животные, суммарная плотность дозы 112 Дж/см ²	через 1 сутки	8,29 (7,49; 9,47) ^{#0}	53,30 (40,10; 71,13) ^{#0}	1376,25 (847,14; 2150,53) ^{#0}
	через 7 суток	6,46 (6,05; 6,89) ^{#0}	41,15 (33,23; 56,53) ^{#0}	947,22 (679,17; 1468,73) ^{#0}
	через 30 суток	6,25 (5,54; 6,94) ^{#0}	46,00 (33,03; 62,98) [#]	1123,71 (682,97; 2436,70) [#]
Группа 3: интактные животные, суммарная плотность дозы 450 Дж/см ²	через 1 сутки	7,78 (6,74; 9,27) ^{#0}	144,00 (61,25; 232,00) ^{#0}	10329,37 (2180,74; 31121,47) ^{#0}
	через 7 суток	5,12 (4,47; 5,75) ⁰	77,55 (60,03; 92,63) ⁰	2917,37 (1823,94; 4287,75) ^{#0}
	через 30 суток	8,90 (7,82; 9,87) ^{#0}	49,15 (39,80; 56,05) [#]	1127,43 (658,19; 1591,63) [#]
Группа 4: животные с экспериментальным гипотиреозом	через 1 сутки	3,47 (3,03; 3,90) ^{1*}	65,25 (46,43; 88,98) [*]	2409,08 (1196,19; 3843,20) [*]
	через 7 суток	4,19 (3,84; 4,66) ^{1*}	47,75 (40,65; 54,38) ^{1*}	1182,59 (851,75; 1943,46) ^{1*}
	через 30 суток	5,87 (4,81; 6,85) ^{1*}	40,00 (31,15; 50,00) ^{1*}	779,69 (506,25; 1086,82) ^{1*}
Группа 5: животные с экспериментальным гипотиреозом, суммарная плотность дозы 112 Дж/см ²	через 1 сутки	7,76 (6,81; 8,63) ^{#0}	40,50 (31,40; 52,83) ^{#0}	734,71 (423,79; 1153,31) ^{#0}
	через 7 суток	11,00 (9,73; 12,40) ^{#0}	44,70 (33,83; 59,60) ⁰	898,41 (623,40; 1390,14) ^{#0}
	через 30 суток	7,63 (7,00; 8,27) ^{#0}	37,75 (29,48; 44,35) ⁰	656,24 (464,05; 865,92) ⁰
Группа 6: животные с экспериментальным гипотиреозом, суммарная плотность дозы 450 Дж/см ²	через 1 сутки	6,23 (5,43; 7,33) ^{#0}	207,00 (95,53; 344,00) ^{#0}	28338,69 (4115,17; 61410,05) ^{#0}
	через 7 суток	4,45 (4,06; 4,96) ^{#0}	73,85 (49,08; 91,68) ^{0*}	2504,98 (1466,21; 4167,30) ^{#0}
	через 30 суток	6,06 (5,25; 6,77) ⁰	47,55 (40,48; 59,48) ^{#0}	979,59 (693,59; 1278,27) ^{#0}

Примечание: ¹p < 0,05 при сравнении группы контроля с группой гипотиреоза; [#]p < 0,05 при сравнении групп лазерного воздействия с группой интактного контроля; *p < 0,05 при сравнении групп лазерного воздействия с группой гипотиреоза; ⁰p < 0,05 при сравнении групп лазерного воздействия.

Таблица 2. Сравнительная характеристика групп животных по ядерно-клеточному отношению и индексу Брауна

Группы	Ядерно-клеточное отношение	Индекс Брауна
Группа 1: интактные животные	32,78 (29,25; 34,43) ^{#1}	4,76 (3,76; 6,72) ^{#1}
Группа 2: интактные животные, суммарная плотность дозы 112 Дж/см ²	через 1 сутки	49,04 (42,99; 55,35) ^{#0}
	через 7 суток	40,04 (32,39; 43,18)
	через 30 суток	36,19 (32,07; 43,72) ⁰
Группа 3: интактные животные, суммарная плотность дозы 450 Дж/см ²	через 1 сутки	30,02 (25,54; 35,62) ⁰
	через 7 суток	36,49 (26,44; 46,73)
	через 30 суток	31,66 (25,76; 36,63) ⁰
Группа 4: животные с экспериментальным гипотиреозом	через 1 сутки	14,90 (13,17; 21,21) ^{1*}
	через 7 суток	23,67 (18,92; 26,45) ^{1*}
	через 30 суток	23,79 (20,75; 29,64) ¹
Группа 5: животные с экспериментальным гипотиреозом, суммарная плотность дозы 112 Дж/см ²	через 1 сутки	29,82 (26,26; 36,28) [*]
	через 7 суток	29,08 (27,24; 37,89) ^{#0}
	через 30 суток	25,87 (22,42; 32,37)
Группа 6: животные с экспериментальным гипотиреозом, суммарная плотность дозы 450 Дж/см ²	через 1 сутки	30,18 (22,63; 31,87) [*]
	через 7 суток	25,51 (19,50; 29,03) ⁰
	через 30 суток	27,33 (23,31; 33,10)

Примечание: ¹p < 0,05 при сравнении группы контроля с группой гипотиреоза; [#]p < 0,05 при сравнении групп лазерного воздействия с группой интактного контроля; *p < 0,05 при сравнении групп лазерного воздействия с группой гипотиреоза; ⁰p < 0,05 при сравнении групп лазерного воздействия.

соответственно, иногда с признаками пролиферации и десквамации. Бледно-голубого цвета коллоид с признаками краевой вакуолизации тесно прилегал к стенке фолликула. Присутствовали интерфолликулярные островки. При данном режиме лазерного воздействия мы отмечали статистически значимое повышение высоты эпителия на всех сроках и уменьшение значений остальных изучаемых показателей: минимального диаметра фолликулов на всех сроках, максимального диаметра через 1 сутки и площади фолликулов через 1 и 30 суток. Индекс Брауна достоверно уменьшался на всех сроках наблюдения, а ядерно-клеточное отношение повышалось на ранних сроках (1 и 7 сутки).

Через сутки после воздействия на щитовидную железу животных с экспериментальным гипотиреозом лазером в дозе 450 Дж/см² в строме органа наблюдали резко выраженное паретическое полнокровие сосудов всех калибров с явлениями эритростазов, сладжированием эритроцитов и мелкими диапедезными периваскулярными

кровоизлияниями, умеренный отек межтучной ткани. Фолликулы во всех полях зрения были неправильной формы, вытянутые, нередко имели складчатые стенки. Тиреоциты находились в состоянии тяжелой белковой дистрофии вплоть до некробиозов и некрозов, отдельные группы клеток были десквамированы в просвет фолликулов. Коллоид в некоторых фолликулах лежал пристеночно, имел мелкозернистую структуру, просветы других фолликулов заполнены пластинами десквамированных клеток, просветы единичных фолликулов практически пусты. Через 7 суток после облучения в строме железы сохранялось венозно-капиллярное полнокровие с картиной эритростазов. Фолликулы были преимущественно округлой формы, тиреоциты — в состоянии диспротеиноза разной степени выраженности (рис. 4). В сравнении с предыдущим сроком исследования (1 сутки) наличие десквамированных тиреоцитов наблюдали в единичных фолликулах. Коллоид в виде бледноокрашенной полоски в большинстве

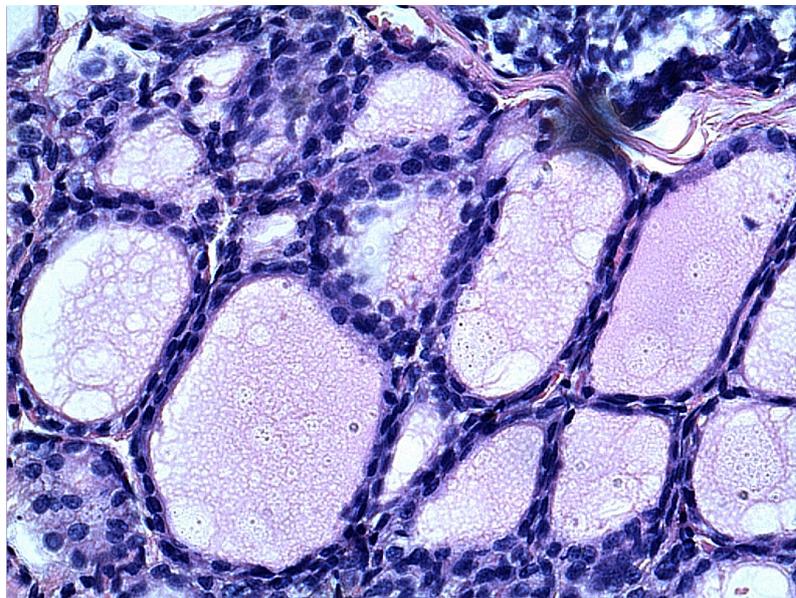


Рис. 3. Результаты лазерного воздействия дозой 112 Дж/см² на животных с экспериментальным гипотиреозом через 7 суток. Окраска: гематоксилин-эозин; ув. ×400

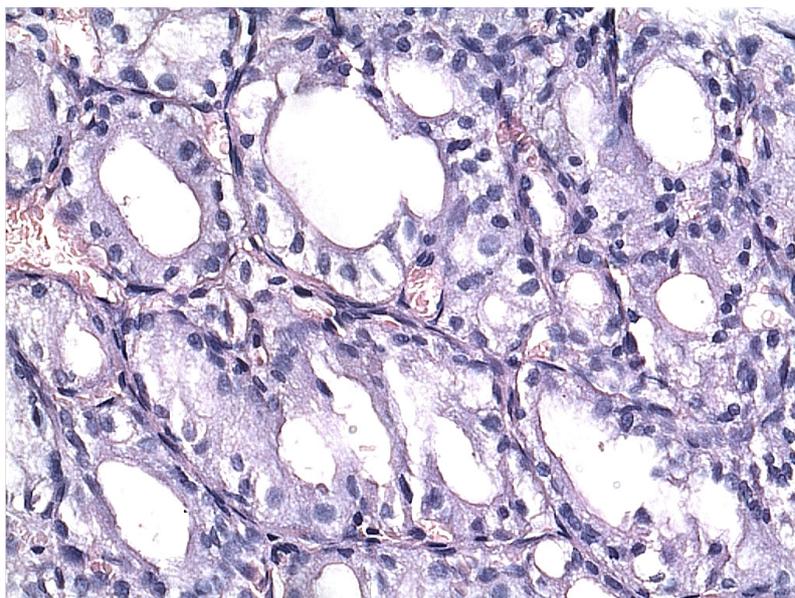


Рис. 4. Результаты лазерного воздействия дозой 450 Дж/см² на животных с экспериментальным гипотиреозом через 7 суток. Окраска: гематоксилин-эозин; ув. ×400

фолликулов лежал пристеночно. Через 30 суток после данного лазерного воздействия полнокровие стромы сохранялось. Тиреоциты имели преимущественно кубическую форму с признаками диспротеиноза разной степени в некоторых полях зрения. Очертания фолликулов ровные округлые или овальные, просвет большей части коллоида пустой. В единичных полях зрения фолликулы были заполнены бледноокрашенным коллоидом с примесью небольшого количества десквамированных тиреоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Структурно-функциональной единицей щитовидной железы традиционно считают фолликул — пузырьвидное образование с полостью внутри. У здоровых крыс фолликулы имеют преимущественно округлую или овальную форму и равномерно распределены по всей паренхиме железы. Стенка фолликула выстлана однослойным эпителием, состоящим из фолликулярных эндокриноцитов (тиреоцитов). Полость фолликула заполнена продуктом секреции тиреоцитов — коллоидом. В зависимости от функционального состояния железы высота эпителия, форма и объем фолликулов изменяются. Так, в нормальных условиях тиреоциты имеют форму куба, а процессы образования и резорбции коллоида уравновешены. При гипопункции щитовидной железы эпителий уплощается, фолликулы обычно увеличиваются в размерах. При гиперфункции тиреоциты становятся цилиндрическими, объем фолликулов уменьшается за счет резорбции коллоида. Степень функциональной активности эпителия щитовидной железы отражают показатели ядерно-клеточного отношения (возрастает с увеличением активности) и индекса Брауна (снижается при усилении активности).

Уменьшение ядерно-клеточного отношения, высоты тиреоидного эпителия и увеличение индекса Брауна, а также площади фолликулов через сутки после моделирования гипотиреоза свидетельствует о снижении функциональной активности щитовидной железы и подтверждается изменением содержания гормонов в сыворотке крови, полученным нами ранее [12]. Через 7 и 30 суток наблюдения животных с моделью гипотиреоза мы отмечали постепенное повышение высоты эпителия, ядерно-клеточного отношения и уменьшение диаметров, площади фолликулов, индекса Брауна, что характерно для восстановления функции щитовидной железы.

Изменения, наблюдаемые нами при лазерном облучении щитовидной железы интактных животных при суммарной плотности дозы с поверхности кожи, равной 112 Дж/см², мы объясняем стимулирующим действием лазера, запуском каскада реакций на клеточном уровне, способствующим улучшению микроциркуляции ткани железы, активации ангиогенеза.

Эффекты лазера реализуются при поглощении фотонов соответствующими длине волны лазера мембранными хромофорами с последующим изменением окислительно-восстановительных процессов клетки и изменением проницаемости кальциевых каналов [13, 14].

По данным литературы одним из эффектов лазерного воздействия является изменение микроциркуляции органа в результате процессов, связанных с локальным синтезом оксида азота [3, 6]. Активация кровотока щитовидной железы после лазерного облучения способствует синтезу гормонов тиреоидным эпителием [10, 15, 16].

Выраженные изменения значений анализируемых показателей щитовидной железы интактных животных после облучения лазером при суммарной плотности дозы с поверхности кожи, равной 450 Дж/см², мы объяснили более жестким воздействием облучения [17]. Применение высоких доз лазера могло являться активатором оксидативного стресса и вызывать необратимые изменения мембранных и структурных клеточных белков [18].

После окончания лазерного воздействия в дозе 112 Дж/см² на щитовидную железу животных с моделью гипотиреоза увеличение высоты эпителия, ядерно-клеточного отношения и уменьшение диаметров и площади фолликулов, а также индекса Брауна было более выражено на ранних сроках наблюдения (1 и 7 сутки), что позволяет говорить о стимулирующем воздействии данной дозы облучения на функциональную активность органа при гипотиреозе и характеризует регенеративные процессы, направленные на восстановление структуры щитовидной железы после повреждающего действия тиреостатика. По данным нашего предыдущего исследования [12] снижение концентрации тиреотропного гормона (ТТГ), увеличение свободной и связанной фракций Т4 и Т3 также позволяют говорить о стимулирующем воздействии лазерного облучения в дозе 112 Дж/см² на щитовидную железу при гипотиреозе.

Изменение анализируемых показателей после воздействия на щитовидную железу животных с экспериментальным гипотиреозом лазером в дозе 450 Дж/см² наряду с морфологической картиной и снижением содержания гормонов, по ранее опубликованным результатам, позволяет сделать вывод об ослаблении функции железы.

При анализе полученных результатов после лазерного воздействия выявлено увеличение всех изучаемых показателей, статистически значимое для высоты эпителия и минимального диаметра фолликулов на ранних сроках (1 и 7 сутки), а для максимального диаметра и площади фолликулов на всех сроках наблюдения. Достоверное повышение ядерно-клеточного отношения наблюдалось через 1 сутки после облучения.

При сравнении двух изучаемых режимов лазерного воздействия на группу интактных животных, оказалось, что высота эпителия была достоверно больше на ранних сроках (1 и 7 сутки) и меньше через 30 суток при лазерном воздействии в дозе 112 Дж/см². Показатели максимального, минимального диаметра и площади фолликулов на сроках наблюдения 1 и 7 суток уменьшались. Индекс Брауна был меньше на ранних сроках наблюдения (1 и 7 сутки) и больше через 30 суток. Ядерно-клеточное отношение больше через 1 и 30 суток.

Сравнение двух изучаемых режимов лазерного воздействия на группу животных с экспериментальным гипотиреозом показало, что воздействие в дозе 450 Дж/см² вызывает достоверное снижение высоты тиреоидного эпителия и увеличение остальных изучаемых показателей на всех сроках исследования. Также повышался индекс Брауна. Статистически значимо уменьшалось ядерно-клеточное отношение через 7 суток наблюдения.

Согласно полученным результатам, воздействие лазера на щитовидную железу характеризуется дозозависимым эффектом с проявлением стимуляции функциональной активности щитовидной железы при суммарной плотности дозы 112 Дж/см², более выраженным на ранних сроках (1 и 7 сутки), и торможением ее активности при дозе 450 Дж/см².

ВЫВОДЫ

Воздействие лазерного излучения средней интенсивности приводит к достоверным изменениям морфофункционального состояния фолликулов щитовидной железы крыс как в норме, так и при экспериментальном гипотиреозе.

Стимулирующее влияние инфракрасного лазерного воздействия с суммарной плотностью дозы 112 Дж/см² на щитовидную железу крыс-самцов с явлениями

гипотиреоза более выражено на ранних сроках наблюдения (1 и 7 сутки), тогда как при дозе 450 Дж/см² наблюдаются тормозящие эффекты на всех сроках наблюдения.

Учитывая полученные нами результаты, использование лазерного инфракрасного воздействия с плотностью дозы 112 Дж/см² на поверхности кожи можно считать предпочтительным для изучения возможностей терапии гипотиреоза в эксперименте.

Литература

1. Абдулхабирова Ф. М. Гипотиреоз и беременность. Поликлиника. 2014; 5: 16–18.
2. Пузин Д. А., Аристархов В. Г., Аристархов Р. В., Квасов А. В. Применение низкоинтенсивной лазеротерапии в лечении субклинического гипотиреоза различной этиологии. Лазерная медицина. 2017; 21 (1): 11–14.
3. Москвин С. В. Эффективность лазерной терапии. Серия «Эффективная лазерная терапия». М.: Издательство «Тверь»; 2015 (2).
4. Кравченко Т. Г., Зарезина А. С., Головнева Е. С. Оценка глубины проникновения лазерного излучения при терапевтическом воздействии методом компьютерного моделирования. Вестник новых медицинских технологий. 2007; 14 (2): 202–4.
5. Кравченко Т. Г., Кудрина М. Г., Гужина А. О., Попов Г. К., Головнева Е. С. Локальные эффекты системного лазерного облучения повышенной мощности. Вестник уральской академической науки. 2012; 2 (39): 126–27.
6. Hofling DB, Chavantes MC, Juliano AG, Cerri GG, Knobel M, Yoshimura EM, et al. Assessment of the effects of low-level laser therapy on the thyroid vascularization of patients with autoimmune hypothyroidism by color Doppler ultrasound. ISRN Endocrinol. 2012 Dec 17: 1–9. PubMed PMID: 23316383.
7. Hofling DB, Chavantes MC, Acencio MM, et al. Effects of low-level laser therapy on the serum TGF- β concentrations in individuals with autoimmune thyroiditis. Laser Surg. 2014; 32 (8): 444–49.
8. Morcos N, Omran M, Ghanem H, Elahdal M, Kamel N, Attia E. Phototherapeutic Effect of Low-Level Laser on Thyroid Gland of Gamma-Irradiated Rats. J Photobiol. 2015; 91 (4): 942–51.
9. Weber JB, Mayer L, Cenci RA, et al. Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model. Laser Surg. 2014; 32 (11): 612–17.
10. Аристархов В. Г. Рекомендации по применению инфракрасного лазерного излучения у больных с патологией щитовидной железы. В сборнике: Материалы научно-практической конференции ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России; 2014 г.; Рязань. RIO РязГМУ 2014.
11. Isman CA, Yegen BC, Alican I. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis. J Endocrinol. 2003; 177 (3): 471–6.
12. Смелова И. В., Головнева Е. С. Динамика функциональной активности тиреоцитов при изменении морфофункционального состояния тучных клеток щитовидной железы под воздействием инфракрасного лазерного излучения. Вестник РГМУ. 2016; 6: 39–44.
13. Chaves ME, Araujo AR, Piancastelli AC, et al. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. An Bras Dermatol. 2014; 89 (4): 616–23.
14. Залесский В. Н. К 50-летию лазерной медицины: молекулярные механизмы лазерной биостимуляции. Украинский медицинский журнал. 2010; 5 (79): 52–58.
15. Pinheiro AL, Browne RM, Frame JW, et al. Mast cells in laser and surgical wounds. Braz Dent J. 1995; 6 (1): 11–16.
16. Козель А. И., Соловьева Л. И., Попов Г. К. К механизму действия низкоинтенсивного лазерного излучения на клетку. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 128 (10): 397–9.
17. Головнева Е. С., Шакиров Н. Н., Кравченко Т. Г., Омеляненко А. Г., Попова И. А. Влияние многократного инфракрасного лазерного облучения зон локализации красного костного мозга на показатели эритроцитарного звена периферической крови. Лазерная медицина. 2013; 17 (4): 33–35.
18. Sun X, Wu S, Xing D. The reactive oxygen species-*Src*-Stat3 pathway provokes negative feedback inhibition of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation. FEBS J. 2010; 277 (22): 4789–802.

References

1. Abdulkhabirova FM. Gipotireoz i beremennost'. Poliklinika. 2014; 5: 16–18. Russian.
2. Puzin DA, Aristarkhov VG, Aristarkhov RV, Kvasov AV. Primenenie nizkointensivnoy lazeroterapii v lechenii subklinicheskogo gipotireoza razlichnoy etiologii. Lazernaya meditsina. 2017; 21 (1): 11–14. Russian.
3. Moskvin SV. Effektivnost' lazernoy terapii. Seriya «Effektivnaya lazernaya terapiya». M.: Izdatelstvo «Tver'»; 2015 (2). Russian.
4. Kravchenko TG, Zarezina AS, Golovneva ES. Otsenka glubiny proniknoveniya la-zernogo izlucheniya pri terapevticheskom vozdeystvii metodom komp'yuternogo modelirovaniya. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2007; 14 (2): 202–4. Russian.
5. Kravchenko TG, Kudrina MG, Guzhina AO, Popov GK, Golovneva ES. Lokal'nye efekty sistemnogo lazernogo oblucheniya povyshennoy moshchnosti. Vestnik ural'skoy akademicheskoy nauki. 2012; 2 (39): 126–7. Russian.
6. Hofling DB, Chavantes MC, Juliano AG, Cerri GG, Knobel M, Yoshimura EM, et al. Assessment of the effects of low-level laser therapy on the thyroid vascularization of patients with autoimmune hypothyroidism by color Doppler ultrasound. ISRN Endocrinol. 2012 Dec 17: 1–9. PubMed PMID: 23316383.
7. Hofling DB, Chavantes MC, Acencio MM, et al. Effects of low-level laser therapy on the serum TGF- β concentrations in individuals with autoimmune thyroiditis. Laser Surg. 2014; 32 (8): 444–49.
8. Morcos N, Omran M, Ghanem H, Elahdal M, Kamel N, Attia E. Phototherapeutic Effect of Low-Level Laser on Thyroid Gland of Gamma-Irradiated Rats. J Photobiol. 2015; 91 (4): 942–51.
9. Weber JB, Mayer L, Cenci RA, et al. Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model. Laser Surg. 2014; 32 (11): 612–17.
10. Aristarkhov VG. Rekomendatsii po primeneniyu infrakrasnogo lazernogo izlucheniya u bol'nykh s patologiyey shchitovidnoy zhelezy. V sbornike: Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii GBOU VPO RyazGMU Minzdrava Rossii; 2014 g.; Ryazan'. RIO RyazGMU 2014. Russian.

11. Isman CA, Yegen BC, Alican I. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis. *J Endocrinol.* 2003; 177 (3): 471–76.
12. Smelova IV, Golovneva ES. Dinamika funktsional'noy aktivnosti tireotsitov pri izmenenii morfofunktsional'nogo sostoyaniya tuchnykh kletok shchitovidnoy zhelezy pod vozdeystviem infrakrasnogo lazernogo izlucheniya. *Vestnik RGMU.* 2016; 6: 39–44.
13. Chaves ME, Araujo AR, Piancastelli AC, et al. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol.* 2014; 89 (4): 616–23.
14. Zalesskiy VN. K 50-letiyu lazernoy meditsiny: molekulyarnye mekhanizmy lazernoy biostimulyatsii. *Ukrainskiy meditsinskiy zhurnal.* 2010; 5 (79): 52–58.
15. Pinheiro AL, Browne RM, Frame JW, et al. Mast cells in laser and surgical wounds. *Braz Dent J.* 1995; 6 (1): 11–16.
16. Kozel AI, Solovyeva LI, Popov GK. K mekhanizmu deystviya nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya na kletku. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 1999; 128 (10): 397–399.
17. Golovneva ES, Shakirov NN, Kravchenko TG, Omelyanenko AG, Popova IA. Vliyanie mnogokratnogo infrakrasnogo lazernogo oblucheniya zon lokalizatsii krasnogo kostnogo mozga na pokazateli eritrotsitarnogo zvena perifericheskoy krovi. *Lazernaya meditsina.* 2013; 17 (4): 33–35.
18. Sun X, Wu S, Xing D. The reactive oxygen species-Src-Stat3 pathway provokes negative feedback inhibition of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation. *FEBS J.* 2010; 277 (22): 4789–802.

АРТЕРИОВЕНОЗНАЯ ФИСТУЛА ПОСЛЕ УДАЛЕНИЯ ВЕСТИБУЛЯРНОЙ ШВАННОМЫ

А. А. Реутов¹ ✉, М. С. Аронов², Ю. В. Кушель³

¹ Центральная клиническая больница с поликлиникой, Управление делами Президента Российской Федерации, Москва

² Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва

³ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени Н. Н. Бурденко, Москва

Формирование артериовенозной фистулы в результате хирургических манипуляций составляет всего 0,22% всех случаев ее возникновения. В работе описано формирование артериовенозной фистулы у пациентки с вестибулярной шванномой, удаленной путем ретросигмовидного доступа. Клинические проявления фистулы в виде пульсирующего шума, усиливающегося при поворотах и наклонах головы, появились отсрочено после выписки. Диагноз был подтвержден с помощью прямой церебральной ангиографии во время повторной госпитализации. Описываются возможные осложнения хирургического лечения, клинические проявления и результаты успешного лечения артериовенозной фистулы путем эндоваскулярного разобщения.

Ключевые слова: вестибулярная шваннома, ретросигмовидный доступ, артериовенозная фистула

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Александрович Реутов
ул. Маршала Тимошенко, д. 15, Москва, 121359; reutov@centerneuro.ru

Статья получена: 19.01.2018 **Статья принята к печати:** 20.02.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.034

FORMATION OF ARTERIOVENOUS FISTULA FOLLOWING SURGICAL RESECTION OF VESTIBULAR SCHWANNOMA

Reutov AA¹ ✉, Aronov MS², Kushel YuV³

¹ Central Clinical Hospital of the Presidential Administration of the Russian Federation, Moscow

² Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow

³ Burdenko Neurosurgical Institute, Moscow

Iatrogenic arteriovenous fistulas make up only 0.22% of all fistulas. This article reports a postoperative arteriovenous fistula in a female patient who initially presented with a vestibular schwannoma and was operated using the retrosigmoid approach. Undesired clinical symptoms developed after the patient had been discharged home, and included pulsatile tinnitus, which intensified when the patient tilted or turned her head. The diagnosis was established based on cerebral angiography findings during the second hospital stay. This case report describes complications of retrosigmoid craniotomy, clinical manifestations of the arteriovenous fistula and successful fistula embolization.

Keywords: vestibular schwannoma, retrosigmoid approach, arteriovenous fistula

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey A. Reutov
ul. Marshala Timoshenko 15, Moscow, 121359; reutov@centerneuro.ru

Received: 19.01.2018 **Accepted:** 20.02.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.034

Вестибулярные шванномы (невриномы слухового нерва), доброкачественные медленно растущие опухоли, происходят из шванновских клеток вестибулярной порции слухового нерва [1]. Частота их выявляемости с развитием нейровизуализационных методов диагностики существенно увеличилась и составляет 0,6–1,9 случая на 100 000 населения [2]. Варианты лечения зависят от возраста, тяжести состояния, неврологического статуса, размера опухоли и ее характеристик. Из способов лечения возможны удаление опухоли, стереотаксическая хирургия и лучевая терапия [3]. Золотым стандартом лечения больших вестибулярных шванном является микрохирургическое удаление опухоли. Оно может быть осуществлено путем транслабиринтного доступа [4], доступа через среднюю черепную ямку [5] или через ретросигмовидный доступ [6]. Ретросигмовидный доступ позволяет удалить вестибулярную шванному любого размера [7]. Тем не менее хирургическое удаление, по-прежнему остается вмешательством, сопряженным с риском смертельного исхода в 0,2% случаев и возникновением возможных послеоперационных осложнений в 22% случаев [8]. Наиболее частые послеоперационные

осложнения, возникшие после удаления вестибулярных шванном путем ретросигмовидного доступа, условно могут быть разделены на две основные группы: неврологические и хирургические. К неврологическим относятся, в основном, повреждения черепно-мозговых нервов. При каудальном распространении опухоли чаще всего поражается бульбарная группа нервов [9]. Частота повреждения лицевого нерва встречается в 25% случаев [10], а тройничного — у 4,7% пациентов [11]. У 12% пациентов, оперированных путем ретросигмовидного доступа, отмечают усугубление шаткости при ходьбе за счет повреждения мозжечка и ствола головного мозга [1]. Ликворея и менингит являются наиболее частыми осложнениями и выявляются в 15% [12] и 14% [13] случаев соответственно. Серьезные сосудистые осложнения в виде кровоизлияния или ишемии, возникающие во время выполнения ретросигмовидного доступа, описываются в 2,7% случаев [14].

Формирование артериовенозной фистулы после ретросигмовидного доступа — очень редкое осложнение с отсроченными клиническими проявлениями [15]. Ретросигмовидный доступ к основанию черепа сопряжен

с хирургическими манипуляциями, производящимися в непосредственной близости к вертебральной артерии и характеризующимися риском ее повреждения. В некоторых случаях значительное повреждение вертебральной артерии во время хирургического вмешательства может остаться незамеченным [16]. Во время ретросигмовидного доступа вертебральная артерия находится вне зоны деятельности нейрохирурга, однако может быть повреждена за счет потери анатомических ориентиров или аномальной анатомии данной области. К таким вариантам относится формирование петли вертебральной артерии в промежутке между большим затылочным отверстием и С2, а также выход ее за пределы канала задней дуги С1 [17]. Риск повреждения во время хирургических манипуляций на верхнешейном уровне составляет 4–8% [18].

Описание клинического случая

В отделение нейрохирургии была госпитализирована пациентка 39 лет с жалобами на глухоту справа, онемением правой половины лица, нарушением координации, шаткостью при ходьбе. По данным МРТ с контрастным усилением у нее выявлена вестибулярная шваннома справа, размером $38,5 \times 35 \times 38$ мм (4 стадия по классификации Koos) с грубой компрессией ствола головного мозга и IV желудочка (рис. 1).

Пациентке выполнили оперативное вмешательство по удалению вестибулярной шванномы справа с нейрофизиологическим мониторингом. Для удаления опухоли использовали ретросигмовидный доступ. Во время препаровки мягких тканей было отмечено профузное кровотечение из стенки вертебральной артерии. Кровотечение было остановлено путем наложения единичного шва и тампонирования небольшого бокового дефекта стенки под прямым визуальным контролем. Пройодимость артерии была полностью сохранена. Опухоль удалили полностью. Послеоперационный период протекал спокойно. В неврологическом статусе отмечено ожидаемое нарастание недостаточности лицевого нерва (4 степень по классификации House–Brackmann) и тройничного нерва. Пациентку выписали из стационара в удовлетворительном состоянии на 8 сутки после операции. После выписки она отметила появление пульсирующего шума, усиливающегося при поворотах и наклонах головы. По результатам контрольной МРТ не

было выявлено послеоперационных осложнений и остатков опухоли (рис. 2), а также не обнаружено явных сосудистых изменений на МРТ в ангиографическом режиме (рис. 3). Учитывая сохраняющуюся симптоматику, пациентку для дальнейшего обследования госпитализировали в отделение рентгенохирургических методов диагностики и лечения.

При поступлении у нее сохранялись жалобы на нарастающий пульсирующий шум и головную боль. В ходе проведения прямой церебральной ангиографии выявлена артериовенозная фистула между правой вертебральной артерией и паравертебральным венозным сплетением. Дистальнее фистулы контрастирования вертебробазилярного бассейна не отмечалось. Правая и левая вертебральные артерии были равнозначны. На момент диагностики фистула обнаруживалась только при антеградном контрастировании (рис. 4). По результатам проведения контралатеральной вертебральной ангиографии контрастирование фистулы не выявлено. Весь вертебробазилярный бассейн, включая правую заднюю нижнюю мозжечковую артерию, кровоснабжался левой вертебральной артерией. После анализа ангиоархитектоники было начато эндоваскулярное вмешательство под общей анестезией. Проводниковый катетер был установлен в проксимальную часть правой вертебральной артерии. В режиме Родмэп под макро-рентген-телевизионным (макро-РТВ) контролем в прямой проекции микрокатетер «Эшелон 10» (Медтроник, США) был проведен при помощи микропроводника «Сильверспид» (Медтроник, США) непосредственно к фистуле. Для предупреждения миграции спиралей в фистулу была использована баллонная ассистенция. Однопросветный баллон «Гиперформ» (Медтроник, США) был раздут проксимально относительно кончика микрокатетера «Эшелон-10». Затем шесть платиновых микроспиралей были плотно упакованы в правую вертебральную артерию непосредственно проксимальнее фистулы. На контрольной ангиографии антеградного контрастирования не отмечалось. Однако было выявлено ретроградное контрастирование фистулы из левой вертебральной артерии. Проводниковый катетер был перемещен в просвет левой вертебральной артерии (рис. 5). Аналогичным образом микрокатетер позиционировали в дистальном отделе правой вертебральной артерии через область слияния позвоночных артерий. Была проведена укладка микроспиралей непосредственно

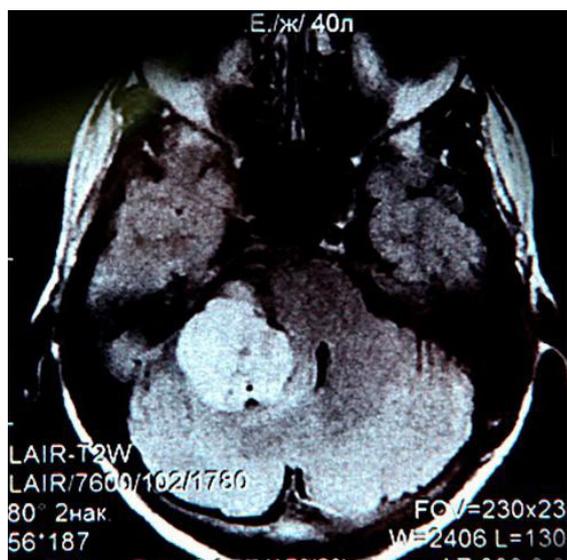


Рис. 1. МРТ с контрастным усилением до операции. Т1-взвешенное изображение. Типичная вестибулярная шваннома справа

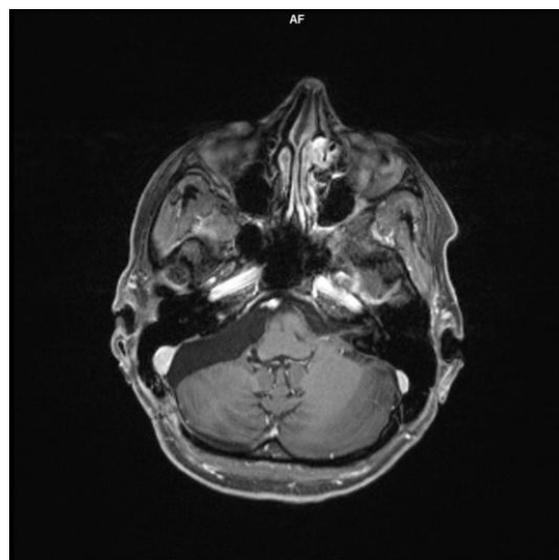


Рис. 2. МРТ с контрастным усилением после операции. Т1-взвешенное изображение. Данных, подтверждающих наличие остатков опухоли и осложнений, нет

между фистулой и устьем правой задней нижней мозжечковой артерии (рис. 6). На контрольных ангиограммах фистула не контрастировалась. Было достигнуто радикальное ее выключение (рис. 7). Непосредственно после вмешательства отмечен полный регресс симптоматики. Пациентка выписана из стационара на следующий день после вмешательства.

Обсуждение клинического случая

Артериовенозная фистула представляет собой патологическое соустье между артериальным и венозным сосудом, минуя капиллярную сеть без формирования собственной мелкососудистой сети. Большинство из них являются приобретенными или ятрогенными, однако описаны и

врожденные формы. Клинические проявления крайне разнообразны и зависят от расположения. Наиболее частыми симптомами служат судороги, головокружение, глазодвигательные нарушения, головная боль и признаки внутричерепной гипертензии [19]. При наличии симптомов и факта интраоперационного повреждения вертебральной артерии правильность и своевременность постановки диагноза, в первую очередь, зависят от настороженности оперирующего хирурга по поводу возможности формирования артериовенозной фистулы [20]. Своевременно выявленная артериовенозная фистула в подавляющем большинстве случаев излечима и требует вмешательства в максимально сжатые сроки, так как является динамично развивающимся патологическим процессом.

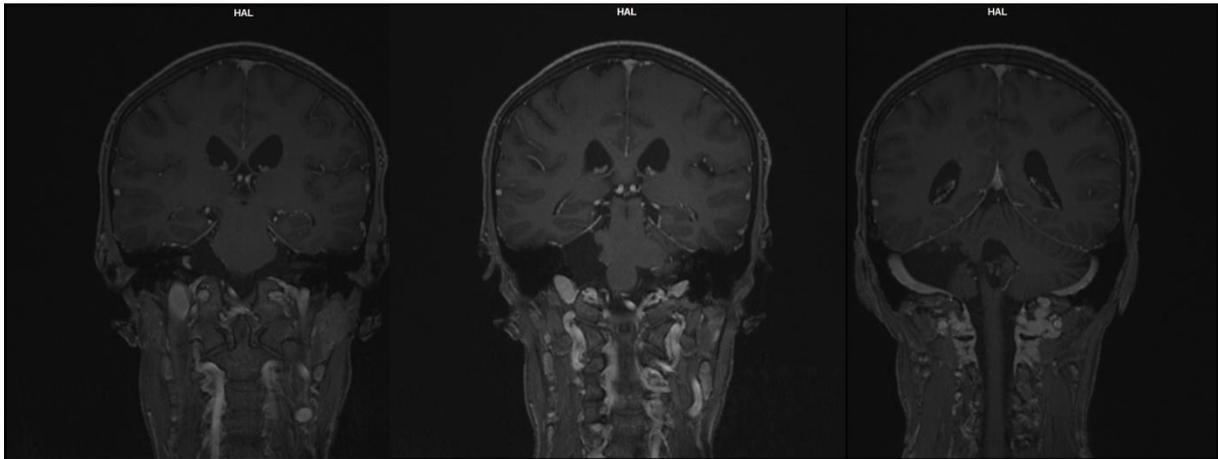


Рис. 3. Снимки, сделанные на послеоперационной МРТ-ангиографии. Не выявлено сосудистых изменений



Рис. 4. Исходная ангиограмма правой позвоночной артерии (А), левой позвоночной артерии (Б) в прямой проекции, правой позвоночной артерии (В) в боковой проекции



Рис. 5. Интраоперационная ангиограмма правой (А, В) и левой (Б) позвоночных артерий в прямой проекции. Отмечается ретроградное контрастирование фистулы из левой вертебральной артерии

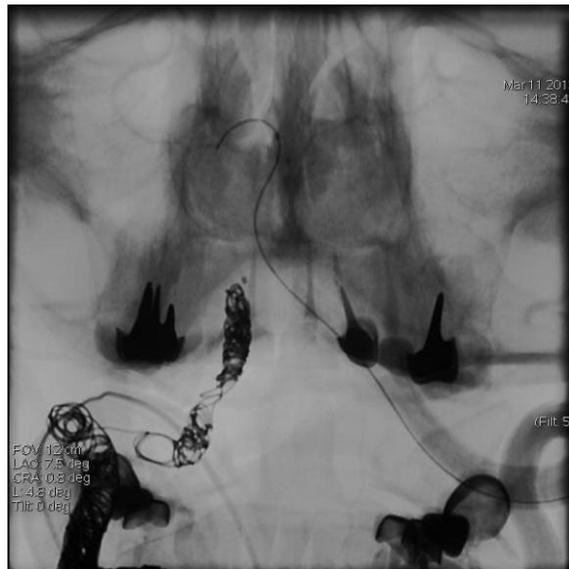


Рис. 6. Окклюзия дистального сегмента правой позвоночной артерии; использован контралатеральный доступ



Рис. 7. Контрольные ангиограммы левой позвоночной артерии в нативном (А) и субтракционном (Б, В) режимах в прямой (В) и боковой (А, Б) проекциях. Отмечается контрастирование вертебробазиллярного бассейна в полном объеме при отсутствии контрастирования фистулы

ВЫВОДЫ

Отсроченное формирование артериовенозной фистулы является редким осложнением хирургического лечения ретро-сигмовидным доступом. Сложности, возникающие при постановке диагноза, обусловлены отсутствием специфических рентгенологических признаков при рутинно используемых нейровизуализационных методах послеоперационного контроля (компьютерной томографии и магнитно-резонансной

томографии). Золотым стандартом диагностики артериовенозных фистул остается прямая церебральная ангиография. Методом выбора является эндоваскулярное разобщение фистулы. Четкое знание анатомии во время доступов к основанию черепа и навыки нейрохирурга в остановке кровотечения из поврежденной артерии снижают риски фатальных осложнений. Тем не менее каждый хирург должен помнить о возможных осложнениях и отдаленных последствиях интраоперационного повреждения позвоночной артерии.

Литература

1. Nonaka Y, et al. Contemporary surgical management of vestibular schwannomas: analysis of complications and lessons learned over the past decade. *Neurosurgery*, 2013; 72 (2 Suppl Operative): 103–15; discussion on 115.
2. Gal TJ, Shinn J, Huang B. Current epidemiology and management trends in acoustic neuroma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 142 (5): 677–81.
3. Pogodzinski MS, Harner SG, Link MJ. Patient choice in treatment of vestibular schwannoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130 (5): 611–6.
4. Arriaga MA, Lin J. Translabyrinthine approach: indications, techniques, and results. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012; 45 (2): 399–415.
5. Angeli S. Middle fossa approach: indications, technique, and results. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012; 45 (2): 417–38.
6. Elhammady MS, Telischi FF, Morcos JJ. Retrosigmoid approach: indications, techniques, and results. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012; 45 (2): 375–97.
7. Rabelo de Freitas M, et al. Analysis of hearing preservation and facial nerve function for patients undergoing vestibular schwannoma surgery: the middle cranial fossa approach versus the retrosigmoid approach—personal experience and literature review. *Audiol Neurootol.* 2012; 17 (2): 71–81.
8. Sughrue ME, et al. Beyond audiofacial morbidity after vestibular schwannoma surgery. *J Neurosurg.* 2011; 114 (2): 367–74.
9. Ebersold MJ, et al. Current results of the retrosigmoid approach to acoustic neurinoma. *J Neurosurg.* 1992; 76 (6): 901–9.

10. McClelland S, 3rd, Guo H, Okuyemi KS. Morbidity and mortality following acoustic neuroma excision in the United States: analysis of racial disparities during a decade in the radiosurgery era. *Neuro Oncol.* 2011; 13 (11): 1252–9.
11. Wiet RJ, et al. Complications in the approach to acoustic tumor surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1986; 95 (1 Pt 1): 28–31.
12. Slattery WH, 3rd, Francis S, House KC, Perioperative morbidity of acoustic neuroma surgery. *Otol Neurotol.* 2001; 22 (6): 895–902.
13. Selesnick SH, et al. The incidence of cerebrospinal fluid leak after vestibular schwannoma surgery. *Otol Neurotol.* 2004; 25 (3): 387–93.
14. Sade B, Mohr G, Dufour JJ. Vascular complications of vestibular schwannoma surgery: a comparison of the suboccipital retrosigmoid and translabyrinthine approaches. *J Neurosurg.* 2006; 105 (2): 200–4.
15. de los Reyes RA, et al. Direct repair of an extracranial vertebral artery pseudoaneurysm: case report and review of the literature. *Neurosurgery.* 1990; 26 (3): 528–33.
16. Inamasu J, Guiot BH. Iatrogenic vertebral artery injury. *Acta Neurol Scand.* 2005; 112 (6): 349–57.
17. George B, Bresson D, Bruneau M. Pathology and surgery around the vertebral artery. Springer-Verlag. Paris: 2011.
18. Schroeder GD, Hsu WK, Vertebral artery injuries in cervical spine surgery. *Surg Neurol Int.* 2013; 4 (Suppl 5): 362–7.
19. Li PM, et al. Dural arteriovenous fistula following translabyrinthine resection of cerebellopontine angle tumors: report of two cases. *Skull Base Rep.* 2011; 1 (1): 51–8.
20. Cohen SD, et al. Dural arteriovenous fistula: diagnosis, treatment, and outcomes. *Laryngoscope.* 2009; 119 (2): 293–7.

References

1. Nonaka Y, et al. Contemporary surgical management of vestibular schwannomas: analysis of complications and lessons learned over the past decade. *Neurosurgery.* 2013; 72 (2 Suppl Operative): 103–15; discussion on 115.
2. Gal TJ, Shinn J, Huang B. Current epidemiology and management trends in acoustic neuroma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 142 (5): 677–81.
3. Pogodzinski MS, Harner SG, Link MJ. Patient choice in treatment of vestibular schwannoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130 (5): 611–6.
4. Ariaga MA, Lin J. Translabyrinthine approach: indications, techniques, and results. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012; 45 (2): 399–415.
5. Angeli S. Middle fossa approach: indications, technique, and results. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012; 45 (2): 417–38.
6. Elhammady MS, Telischi FF, Morcos JJ. Retrosigmoid approach: indications, techniques, and results. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012; 45 (2): 375–97.
7. Rabelo de Freitas M, et al. Analysis of hearing preservation and facial nerve function for patients undergoing vestibular schwannoma surgery: the middle cranial fossa approach versus the retrosigmoid approach—personal experience and literature review. *Audiol Neurootol.* 2012; 17 (2): 71–81.
8. Sughrue ME, et al. Beyond audiofacial morbidity after vestibular schwannoma surgery. *J Neurosurg.* 2011; 114 (2): 367–74.
9. Ebersold MJ, et al. Current results of the retrosigmoid approach to acoustic neurinoma. *J Neurosurg.* 1992; 76 (6): 901–9.
10. McClelland S, 3rd, Guo H, Okuyemi KS. Morbidity and mortality following acoustic neuroma excision in the United States: analysis of racial disparities during a decade in the radiosurgery era. *Neuro Oncol.* 2011; 13 (11): 1252–9.
11. Wiet RJ, et al. Complications in the approach to acoustic tumor surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1986; 95 (1 Pt 1): 28–31.
12. Slattery WH, 3rd, Francis S, House KC, Perioperative morbidity of acoustic neuroma surgery. *Otol Neurotol.* 2001; 22 (6): 895–902.
13. Selesnick SH, et al. The incidence of cerebrospinal fluid leak after vestibular schwannoma surgery. *Otol Neurotol.* 2004; 25 (3): 387–93.
14. Sade B, Mohr G, Dufour JJ. Vascular complications of vestibular schwannoma surgery: a comparison of the suboccipital retrosigmoid and translabyrinthine approaches. *J Neurosurg.* 2006; 105 (2): 200–4.
15. de los Reyes RA, et al. Direct repair of an extracranial vertebral artery pseudoaneurysm: case report and review of the literature. *Neurosurgery.* 1990; 26 (3): 528–33.
16. Inamasu J, Guiot BH. Iatrogenic vertebral artery injury. *Acta Neurol Scand.* 2005; 112 (6): 349–57.
17. George B, Bresson D, Bruneau M. Pathology and surgery around the vertebral artery. Springer-Verlag. Paris: 2011.
18. Schroeder GD, Hsu WK, Vertebral artery injuries in cervical spine surgery. *Surg Neurol Int.* 2013; 4 (Suppl 5): 362–7.
19. Li PM, et al. Dural arteriovenous fistula following translabyrinthine resection of cerebellopontine angle tumors: report of two cases. *Skull Base Rep.* 2011; 1 (1): 51–8.
20. Cohen SD, et al. Dural arteriovenous fistula: diagnosis, treatment, and outcomes. *Laryngoscope.* 2009; 119 (2): 293–7.

АКТУАЛЬНОСТЬ УДАЛЕНИЯ НЕВУСА ЯДАССОНА У ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА

Т. А. Гайдина^{1,2}✉, А. С. Дворников¹, П. А. Скрипкина¹, Г. Б. Арутюнян¹

¹Кафедра дерматовенерологии, лечебный факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

²ООО Компания РЕДНОР, Москва

Одним из доброкачественных образований кожи является себорейный невус Ядассона (NSJ) — гамартома, локализуемая преимущественно на коже лица или волосистой части головы и одинаково часто встречающаяся у мужчин и женщин. Плюрипотентные первичные эпителиальные клетки, входящие в структуру NSJ, являются благоприятной средой для развития на его фоне как доброкачественных, так и злокачественных опухолей. Для исключения неопластической трансформации целесообразно удалять NSJ сразу после полового созревания. При невозможности хирургического вмешательства пациентам требуется постоянное динамическое наблюдение. В данной работе представлено два случая успешного удаления CO₂-лазером NSJ у пациентов молодого возраста.

Ключевые слова: невус себорейный Ядассона, доброкачественные образования кожи, злокачественная трансформация невуса, удаление CO₂-лазером

✉ **Для корреспонденции:** Гайдина Татьяна Анатольевна
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; doc429@yandex.ru

Статья получена: 05.05.2018 **Статья принята к печати:** 12.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.033

RATIONALE FOR REMOVING NEVUS SEBACEUS OF JADASSOHN IN YOUNG PATIENTS

Gaydina TA^{1,2}✉, Dvornikov AS¹, Skripkina PA¹, Arutyunyan GB¹

¹Department of Dermatology and Venereology, Faculty of General Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

²REDNOR OOO, Moscow

Nevus sebaceous of Jadassohn (NSJ) is a benign skin lesion, a hamartoma typically localized to the face or scalp and equally common in men and women. Pluripotent epithelial cells that give rise to NSJ provide a favorable environment for benign and malignant tumors to form in the nevus. Because of the possibility of malignant transformation, NSJ should be removed after puberty. If surgery is impossible, long-term observation is indicated. In this work we present two cases of successful NSJ treatment with the CO₂ laser in young patients.

Keywords: nevus sebaceous of Jadassohn, benign skin lesion, malignant nevus transformation, CO₂ laser treatment

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Gaydina
Ostrovityanova 1, 117997; doc429@yandex.ru

Received: 05.05.2018 **Accepted:** 12.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.033

В 1895 г. немецкий дерматовенеролог Joseph Jadassohn впервые описал гамартому сальных желёз [1]. Невус сальных желёз Ядассона (син.: Nevus sebaceous Jadassohn, NSJ, невус сальных желёз, себорейный невус) — врожденный органоидный невус, локализующийся преимущественно на коже лица или волосистой части головы и одинаково часто встречающийся у лиц обоего пола (рис. 1). Развитие невуса обусловлено пролиферацией и мальформацией сальных желёз и является результатом дифференцировки плюрипотентных клеток в сторону зрелых сальных и апокриновых структур [2]. Клинически NSJ представлен бессимптомной солитарной слегка приподнятой над уровнем кожи бляшкой округлой или линейной формы размером до 10 см и имеет мелкие полушаровидные папулы розового, желтого или коричневого цвета с гладкой или папилломатозной поверхностью. Для NSJ характерны возрастные особенности, связанные с

дифференцировкой сальных и потовых желёз [3]. У детей раннего возраста невус лишен волос, малозаметен и имеет гладкую или слабовыраженную сосочковую поверхность. В период полового созревания NSJ становится более выпуклым, покрывается тесно прилегающими друг к другу папулами, цвет которых варьирует от светло-желтого до темно-коричневого. При гистологическом исследовании NSJ у пациентов старшего возраста можно обнаружить неправильное формирование эпидермиса и долек зрелых сально-волосных фолликулов, большое количество различных эпителиальных структур (расширенные апокриновые железы, abortивные волосные фолликулы) [4]. У лиц подросткового возраста встречаются скопления недифференцированных клеток, напоминающие очаги базалиомы [2].

В данной работе описаны два клинических случая удаления невуса сальных желёз Ядассона с использованием CO₂-лазера.

Описание клинических случаев

Случай 1

Пациент К., мужчина, 18 лет, обратился в клинику с жалобами на образование, локализованное на коже левой половины спинки носа (рис. 2). *Анамнез*: образование было у пациента с рождения. В период полового созревания он стал отмечать его незначительный рост и скудное отделяемое светло-жёлтого цвета, появляющееся при надавливании. Молодой человек неоднократно пытался самостоятельно выдавить и удалить раздражающее его образование. Год назад в центре образования появился вырост, который в течение последних 6 месяцев увеличился до 0,5 см (рис. 3). *Status localis*: кожный покров лица нормальной окраски, в Т-образной зоне наблюдается избыточное салоотделение, комедоны закрытого типа. На коже левой половины спинки носа папулы, сливающиеся в продолговато-овальную бляшку размером 0,5 × 0,8 см светло-розового цвета, имеющую дольчатое строение и незначительно возвышающуюся над уровнем кожи. В центре образования расположен вырост цилиндрической формы 0,1 × 0,1 см в основании и 0,5 см высотой. На верхушке выроста плотные слоистые роговые массы. При пальпации образование мягкое, безболезненное. *Гистологическое исследование*: выявлены папилломатозная эпидермальная гиперплазия и гиперплазия сальных желез. *Клинический диагноз*: D23.3, себорейный невус Ядассона, кожный рог. С учётом локализации и небольшого размера образования было принято решение об удалении образования CO₂-лазером под местной анестезией. Осмотр через 2 недели после удаления показал формирование нормотрофического рубца (рис. 4)

Случай 2

Пациентка А., женщина, 30 лет, обратилась в клинику с целью эстетической коррекции образования на коже лба (рис. 5). *Анамнез*: образование было у пациентки с рождения. В период полового созревания образование незначительно увеличилось в объеме, стало более выступающим над поверхностью кожи и приобрело более тёмный цвет. За последние десять лет никаких изменений пациентка не отмечала. *Status localis*: кожный покров лица нормальной окраски. На коже лба имеются папулы, сливающиеся в продолговато-овальную бляшку размером 1,7 × 1,1 см светло-коричневого цвета с бугристой поверхностью. Образование характеризуется дольчатым строением и незначительно возвышается над уровнем кожи. При пальпации мягкое, безболезненное. *Гистологическое исследование*: выявлена субэпителиальная пролиферация сальных желез (рис. 6). *Клинический диагноз*: D23.3, себорейный невус Ядассона. У пациентки под местной анестезией проведено удаление образования CO₂-лазером. Осмотр через 2 недели после удаления показал формирование нормотрофического рубца (рис. 7).

Обсуждение клинических случаев

Существуют разные мнения по поводу сроков и целесообразности удаления NSJ. До полового созревания NSJ, как правило, малозаметен. После полового созревания в NSJ происходит развитие вторичных доброкачественных новообразований с частотой 10–30% [5]. В литературе описаны различные доброкачественные опухоли, развившиеся



Рис. 1. Себорейный невус Ядассона на коже щеки у женщины 35 лет



Рис. 2. Пациент К., 18 лет. Себорейный невус Ядассона с кожным рогом на коже спинки носа. Вид сбоку



Рис. 3. Тот же пациент. Себорейный невус Ядассона с кожным рогом на коже спинки носа. Вид спереди



Рис. 4. Тот же пациент. Формирование нормотрофического рубца после удаления невуса Ядассона CO₂-лазером



Рис. 5. Пациентка А., 30 лет. Себорейный невус Ядассона на коже лба

в NSJ, из которых наиболее часто встречаются трихобластома и сириngoцистаденома [6]. Такая трансформация NSJ приносит пациентам дополнительный дискомфорт и требует эстетической коррекции. Развитие кожного рога на фоне NSJ — редкое явление [7, 8]. Точных статистических данных о частоте злокачественной трансформации NSJ нет. Редкость злокачественной трансформации отмечают отечественные исследователи [2] и некоторые зарубежные источники [9]. Другие авторы указывают на злокачественную трансформацию в 22% случаев [10], большинство из которых описаны у пациентов старше 50 лет [11, 12]. Доказано, что риск злокачественной трансформации увеличивается с возрастом [11]. Описаны случаи развития множественных новообразований в пределах одного и того же NSJ у лиц старше 50 лет [13]. Типичная локализация NSJ на коже лица и волосистой части головы также служит одним из факторов риска перерождения в злокачественный тип опухоли. Клеточная структура NSJ (глюрипотентные первичные эпителиальные клетки) служит благоприятной средой для развития на его фоне злокачественных новообразований [2, 4]. Учитывая, что риск злокачественной трансформации существует, а наличие самого невуса сопровождается у пациентов проблемами эстетического характера, авторы считают целесообразным производить удаление NSJ у пациентов после полового созревания. Выбор метода удаления у пациентов молодого возраста достаточно широкий: кюретаж, коагуляция, криотерапия, фотодинамическая терапия, лазерная абляция, хирургическое иссечение. Опыт успешного применения CO₂-лазера с хорошим косметическим эффектом описан у детей [14]. Этот

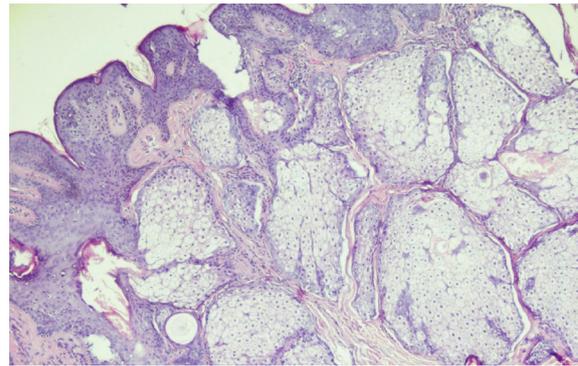


Рис. 6. Фрагмент кожи с субэпителиальной пролиферацией сальных желёз. Окраска: гематоксилин-эозин; увеличение ×40



Рис. 7. Пациентка А., 30 лет. Формирование нормотрофического рубца после удаления CO₂-лазером невуса Ядассона на коже лба

метод характеризуется высокой эффективностью, меньшим повреждением нормальных тканей и хорошим косметическим эффектом. У пациентов старше 50 лет удаление следует проводить радикальным хирургическим способом. В случае невозможности сделать это по каким-либо причинам показано постоянное динамическое наблюдение.

ВЫВОДЫ

Представленные клинические случаи демонстрируют хороший косметический эффект после удаления NSJ CO₂-лазером. Данный метод может быть рекомендован как метод выбора удаления NSJ размером до 2–3 см² у лиц молодого возраста.

Литература

- Lantis S, Leyden J, Heaton C. Nevus sebaceous Jadassohn. Arch Dermatol 1968, 98: 117–23.
- Молочков В. А., Марди Ш. К развитию базалиомы на фоне невуса сальных желёз Ядассона. Альманах клинической медицины. 2007; 15: 232–5.
- Simi C, Rajalakshmi T, Correa M. Clinicopathologic analysis of 21 cases of nevus sebaceous: A retrospective study. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2008; 74 (6): 625–7.
- Alessi E, Sala F. Nevus sebaceous. A clinicopathologic study of its evolution. Am J Dermatopathol. 1986; 8 (1): 27–31.
- Liu Y, Valdebran M, Chen J, Elbendary A, Wu F, Xu M. Nevus sebaceous of Jadassohn with eight secondary tumors of follicular, sebaceous, and sweat gland differentiation. Am J Dermatopathol. 2016; 38 (11): 861–6.
- Jaqueti G, Requena L, Sánchez Yus E. Trichoblastoma is the most common neoplasm developed in nevus sebaceous of Jadassohn. A clinicopathologic study of a series of 155 cases. Am J Dermatopathol. 2000; 22 (2): 108–18.
- Pointdujour-Lim R, Marous MR, Satija CE, Douglass AM, Eagle RC, Shields CL. Cutaneous Horn of the Eyelid in 13 Cases. Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery. 2017; 33 (4): 233–6.
- Arvas L, Livaoglu M, Karacal N, Sozen E, Kara B. Giant cutaneous horn with naevus sebaceous. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2007; 60 (11): 1268–9.
- Kamyab-Hesari K, Seirafi H, Jahan S, Aghzadeh N, Hejazi P, Azizpour A, et al. Nevus sebaceous: A clinicopathological study of 168 cases and review of the literature. Int J Dermatol. 2016; 55 (2): 193–200.
- Westfried M, Mikhail GR. Multifocal Basal-Cell Carcinomas in a Nevus Sebaceous of Jadassohn. J Dermatol Surg Oncol. 1981; 7 (5): 420–2.
- Idriss MH, Elston DM. Secondary neoplasms associated with

- nevus sebaceus of Jadassohn: A study of 707 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 70 (2): 332–7.
12. Jardim MML, Souza BC, Fraga RC. Rare desmoplastic trichilemmoma associated with sebaceous nevus. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2017; 92 (6): 836–7.
 13. Liu Y, Valdebran M, Chen J, Elberdary A, Wu F, Xu M. Nevus Sebaceous of Jadassohn with Eight Secondary Tumors of Follicular, Sebaceous, and Sweat Gland Differentiation. *Am J Dermatopathol*. 2016; 38 (11): 861–6.
 14. Ashinoff R. Linear Nevus Sebaceous of Jadassohn Treated with the Carbon Dioxide Laser. *Pediatr Dermatol*. 1993; 10 (2):189–91.

References

1. Lantis S, Leyden J, Heaton C. Nevus sebaceous Jadassohn. *Arch Dermatol* 1968, 98: 117–23.
2. Molochkov VA, Mardi Sh. K razvitiyu bazaliomy na fone nevusa sal'nyh zheljoz Jadassona. *Al'manah klinicheskoy mediciny*. 2007; 15: 232–5.
3. Simi C, Rajalakshmi T, Correa M. Clinicopathologic analysis of 21 cases of nevus sebaceous: A retrospective study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008; 74 (6): 625–7.
4. Alessi E, Sala F. Nevus sebaceous. A clinicopathologic study of its evolution. *Am J Dermatopathol*. 1986; 8 (1): 27–31.
5. Liu Y, Valdebran M, Chen J, Elberdary A, Wu F, Xu M. Nevus sebaceous of Jadassohn with eight secondary tumors of follicular, sebaceous, and sweat gland differentiation. *Am J Dermatopathol*. 2016; 38 (11): 861–6.
6. Jaqueti G, Requena L, Sánchez Yus E. Trichoblastoma is the most common neoplasm developed in nevus sebaceous of Jadassohn. A clinicopathologic study of a series of 155 cases. *Am J Dermatopathol*. 2000; 22 (2): 108–18.
7. Pointdujour-Lim R, Marous MR, Satija CE, Douglass AM, Eagle RC, Shields CL. Cutaneous Horn of the Eyelid in 13 Cases. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*. 2017; 33 (4): 233–6.
8. Arvas L, Livaoglu M, Karacal N, Sozen E, Kara B. Giant cutaneous horn with naevus sebaceous. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2007; 60 (11): 1268–9.
9. Kamyab-Hesari K, Seirafi H, Jahan S, Aghzadeh N, Hejazi P, Azizpour A, et al. Nevus sebaceous: A clinicopathological study of 168 cases and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2016; 55 (2): 193–200.
10. Westfried M, Mikhail GR. Multifocal Basal-Cell Carcinomas in a Nevus Sebaceous of Jadassohn. *J Dermatol Surg Oncol*. 1981; 7 (5): 420–2.
11. Idriss MH, Elston DM. Secondary neoplasms associated with nevus sebaceous of Jadassohn: A study of 707 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 70 (2): 332–7.
12. Jardim MML, Souza BC, Fraga RC. Rare desmoplastic trichilemmoma associated with sebaceous nevus. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2017; 92 (6): 836–7.
13. Liu Y, Valdebran M, Chen J, Elberdary A, Wu F, Xu M. Nevus Sebaceous of Jadassohn with Eight Secondary Tumors of Follicular, Sebaceous, and Sweat Gland Differentiation. *Am J Dermatopathol*. 2016; 38 (11): 861–6.
14. Ashinoff R. Linear Nevus Sebaceous of Jadassohn Treated with the Carbon Dioxide Laser. *Pediatr Dermatol*. 1993; 10 (2):189–91.

МНОЖЕСТВЕННАЯ РЕПЛАНТАЦИЯ ЗУБОВ

А. В. Иващенко¹, И. М. Федяев², А. Е. Яблоков²✉, И. Н. Колганов², Е. И. Баландин³, В. П. Тлустенко²

¹ Инновационный стоматологический центр, Самара

² Самарский государственный медицинский университет, Самара

³ Медицинский университет «Реавиз», Самара

В настоящее время одной из альтернатив операции удаления зуба является реплантация. Методика позволяет сохранить зуб, подлежащий удалению, который в последующем может служить опорой для различных ортопедических конструкций. Показаниями к реплантации зуба являются: наличие очага инфекции в периапикальной области при неэффективности консервативных методов лечения, невозможность проведения резекции верхушки корня и т. д. У пациентки С., обратившейся с жалобами на частичное отсутствие зубов, были выявлены значительные разрушения коронковой части зубов верхней и нижней челюстей. После удаления с последующей реплантацией через 3 месяца была выполнена ортопантограмма. На рентгенографии выявлено равномерное заполнение корневых каналов цементом по всей длине и состоятельная трабекулярная костная ткань в области верхушек корней реплантированных зубов. С опорой на реплантируемые зубы были установлены несъемные металлокерамические конструкции. В последующем проведено протезирование съемными ортопедическими протезами. По результатам проведенного лечения и анализа рентгенологических данных за двухлетний срок наблюдения нами было установлено отсутствие патологической подвижности у реплантированных зубов, состоятельность костной ткани в области их верхушек и стабильность ортопедических конструкций, опорой для которых послужили реплантированные зубы.

Ключевые слова: реплантация зуба, резекция верхушки корня, удаление зуба, протезирование

✉ **Для корреспонденции:** Яблоков Алексей Евгеньевич
ул. Ново-Вокзальная, д. 167А, кв. 61, г. Самара, 443016; s1131149@yandex.ru

Статья получена: 04.04.2018 **Статья принята к печати:** 10.04.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.030

INTENTIONAL REPLANTATION OF MULTIPLE TEETH

Ivashchenko AV¹, Fedyayev IM², Yablokov AE²✉, Kolganov IN², Balandin EI³, Tlustenko VP²

¹ Innovative Dental Center, Samara

² Samara State Medical University, Samara

³ Medical University Reaviz, Samara

One of the alternatives to permanent tooth removal is intentional reimplantation. A tooth saved by reimplantation can later serve as a support for various types of dental prostheses. Tooth replantation is indicated if there is an infection in the periapical area unresponsive to conservative treatment or apicoectomy is not possible, etc. The female patient S. presented with missing teeth and significant coronal decay both on the upper and lower jaws. Three months after the teeth had been extracted and reimplanted, the patient underwent another panoramic radiography scan. On the post-op orthopantomogram the dental cement appeared evenly distributed in the root canals and the trabecular bone tissue was rebuilding in the periapical area of the replanted teeth. Later, we installed fixed dental porcelain-fused-to-metal prostheses supported by the replanted teeth. The patient also received removable dentures. A 2-year follow-up showed no signs of pathologic mobility in the replanted teeth, robust trabecular tissue regeneration in the periapical area and stability of dental prostheses supported by the replanted teeth.

Keywords: tooth reimplantation, apicoectomy, tooth extraction, prosthodontics

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey E. Yablokov
Novo-Vokzalnaya 167A, kv. 61, Samara, 443016; s1131149@yandex.ru

Received: 04.04.2018 **Accepted:** 10.04.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.030

Реплантация — возвращение удаленного зуба в его же альвеолу. Зуб, подлежащий реплантации, должен иметь хорошо сохранившуюся коронку и не иметь в значительной степени расходящихся или искривленных корней [1–4]. Данная методика позволяет в дальнейшем использовать реплантированный зуб для покрытия его металлокерамической, цельнолитой или штампованной коронкой [5–6]. Прогноз жизнеспособности реплантированного зуба наиболее благоприятный при периодонтальном и наименее — при остеоидном типе приживления. Функция пересаженого зуба сохраняется от года до 3 лет и более. Наиболее длительные сроки отмечаются при пересадке здорового зуба, случайно удаленного или вывихнутого из лунки [7–9].

Дальнейшее научно-практическое совершенствование проведения операций реплантации зубов позволит решать проблемы частичного отсутствия зубов на новом уровне [10–12]. Целью работы было изучение особенности регенерации костной ткани в периапикальной зоне у реплантируемых зубов.

Описание клинического случая

Пациентка С., 41 год, обратилась с жалобами на частичное отсутствие зубов. В результате осмотра полости рта и анализа ортопантограммы были выявлены значительные разрушения коронковой части зубов верхней и нижней

челюстей 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6, 2.4, 2.5, 2.7, 3.2, 3.4, 3.7, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 (рис. 1).

На основании полученных данных было принято решение об удалении зубов 1.2, 1.4, 1.6, 2.4, 2.5, 2.7, 3.1, 3.2, 3.7, 4.1, 4.3, 4.6 и реплантации зубов 1.1, 1.3, 3.4, 4.4, 4.5. Под местной анестезией Septanest 1 : 100 000 (1,7мл.) (Septodont, Франция) в проекцию указанных зубов за несколько посещений провели их удаление. Пациентке предложили провести реплантацию одномоментно с удалением зубов. Экстракцию реплантируемых зубов 1.1, 1.3, 3.4, 4.4 проводили щадяще, с максимальным сохранением тканей периодонта и надкостницы. В процессе удаления зуба 4.5 были повреждены дистальная часть надкостницы, частично костная ткань и периодонт. После удаления корней указанных зубов провели внеротовую резекцию верхушек корней с ретроградным пломбированием корневых каналов цементом. Затем пациентке предложили провести реплантацию зубов 1.1, 1.3, 3.4, 4.4, 4.5 с последующей установкой штифтовых вкладок и дальнейшим ортопедическим лечением. Через 3 месяца после реплантации выполнили ортопантограмму (рис. 2). В результате рентгенографии выявили равномерное заполнение корневых каналов цементом по всей длине и состоятельную

трабекулярную костную ткань в области верхушек корней реплантированных зубов. С опорой на реплантируемые зубы были установлены несъемные металлокерамические конструкции. В последующем проведено протезирование съемными ортопедическими протезами. Также были изготовлены несъемные металлокерамические конструкции. Съемное протезирование было выполнено с применением частичных съемных протезов на верхнюю и нижнюю челюсти. При изготовлении протеза было использовано армирование хром-кобальт-никелевым сплавом.

По прошествии 2 лет в результате контрольного осмотра было установлено отсутствие патологической подвижности у реплантированных зубов, пациентка жалоб не предъявляла. На интраоральных визиографических снимках зубов 1.1, 1.2, 1.3, 3.4 выявлена состоятельная трабекулярная костная ткань в проекции верхушек корней, очагов воспаления не обнаружено (рис. 3 А, Б).

Обсуждение клинического случая

За период наблюдения периодонтальное пространство прослеживалось на всем протяжении поверхности корней зубов 1.1–1.3. После проведения реплантации признаки



Рис. 1. Ортопантограмма пациентки С., 41 год, на момент начала лечения

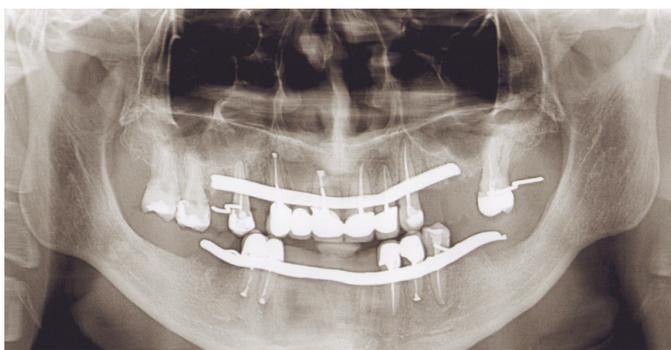


Рис. 2. Ортопантограмма той же пациентки через 3 месяца после реплантации



Рис. 3. (А, Б). Прицельная рентгенография реплантированных зубов 1.1–1.3, 3.4 у той же пациентки



Рис. 4. Прицельная рентгенография реплантированных зубов 4.4, 4.5 у той же пациентки



Рис. 5. Та же пациентка. Общий вид рта после установки ортопедических конструкций на реплантированные зубы. Период наблюдения длился 2 года

патологии костной ткани в области корней указанных зубов отсутствовали. Данное наблюдение позволяет сделать предположение о наличии процесса фиброостеоинтеграции данных зубов.

При проведении прицельной рентгенографии 4.4, 4.5 зубов (рис. 4) в области зуба 4.5 были выявлены очаги деминерализации корня, а также сглаживание периодонтальной щели на дистальных участках, отсутствие очага воспаления в области верхушки корня. При пальпации указанных зубов, определялась их стабильность, патологическая подвижность отсутствовала. Данный негативный результат реплантации связан, по нашему мнению, с травматичным удалением корней этих зубов, так как проведение экстракции зуба 4.5 сопровождалось значительным повреждением тканей периодонта и надкостницы.

Выводы

По результатам проведенного лечения и анализа рентгенологических данных за двухлетний срок наблюдения (рис. 5) нами было установлено, что патологическая подвижность у реплантированных зубов отсутствует, костная ткань в области верхушек у данных зубов состоятельна, ортопедические конструкции, опорой для которых послужили реплантированные зубы, стабильны. Анализ зависимости сложности удаления и последующей реплантации позволил сделать вывод, что положительный результат реплантации может быть достигнут путем бережного отношения к тканям периодонта и надкостницы. Таким образом, успех реплантации напрямую зависит от двух факторов: объема разрушения корня зуба и степени повреждения надкостницы и периодонта при удалении.

Литература

1. Andersen JO. Atlas of replantation and transplantation of teeth. Philadelphia: Saunders; 1992. p. 207.
2. Космагамбетова А. Т. История развития операции реплантации зуба. Проблемы стоматологии. 2007; 4: 66–8.
3. Коваленко Е. В., Антонова А. А. Реплантации постоянных зубов у детей. Проблемы и пути решения. Фундаментальные исследования. 2012; 12 (1): 78–81.
4. Пантюхин А. И. Возможности регенерации реплантированного зуба. Сборник статей I международного конгресса по проблемам зубной трансплантологии. Уфа. 1994: 35–7.
5. Иващенко А. В., Баландин Е. И., Зубков Д. В. Роль тканей периодонта в репаративных процессах при реплантации зубов (ближайшие варианты). Клиническая стоматология. 2016; 4 (80): 52–4.
6. Кован Р. Д. Целенаправленная реплантация опорного зуба для удержания съемного частичного протеза. Квинтэссенция (стомат. ежегодник). 1992: 95–100.
7. Богатов А. И. Модифицированный способ реплантации зубов. Сборник статей I международного конгресса по проблемам зубной трансплантологии. Уфа. 1994: 40–2.
8. Богатов А. И. Реплантация зубов. Сборник статей V съезда стоматологической ассоциации России. Москва. 1999: 226–7.
9. Секлетов Г. А. Особенности подготовки зуба к реплантации при полном вывихе зуба. Стоматология. 2008; 87 (1): 83–4.
10. Митрофанов В. И. Реплантация — за и против. Клинический случай реплантации корня, разрушенного и восстановленного культевой вкладкой, с целью сохранения мостовидной конструкции, включающей проблемный зуб, в области которого возник свищевой ход. Эндодонтия Today. 2010; 4: 39–41.
11. Гиоева Ю. А., Матвеева М. Н. Аутогенная трансплантация зубов. Ортодонтия. 2010; 1 (49): 44–52.
12. Михайлова Е. В. Одномоментная реплантация ретинированного зуба при ортодонтической коррекции. Ортодент-Инфо. 1998; 3: 45–6.

References

1. Andersen JO. Atlas of replantation and transplantation of teeth. Philadelphia: Saunders; 1992. p. 207.
2. Kosmagambetova A. T. Istorija razvitija operacij replantacii zuba. Problemy stomatologii. 2007; 4: 66–8.
3. Kovalenko E. V., Antonova A. A. Replantacii postojannyh zubov u detej. Problemy i puti reshenija. Fundamental'nye issledovanija. 2012; 12 (1): 78–81.
4. Pantjuhin A. I. Vozmozhnosti regeneracii replantirovannogo zuba. Sbornik statej I mezhdunarodnogo kongressa po problemam zubnoj transplantologii. Ufa. 1994: 35–7.
5. Ivashhenko A. V., Balandin E. I., Zubkov D. V. Rol' tkanej periodonta v reparativnyh processah pri replantacii zubov (blizhajshie varianty). Klinicheskaja stomatologija. 2016; 4 (80): 52–4.
6. Kovan R. D. Celenapravlennaja replantacija opornogo zuba dlja uderzhanija s'emnogo chastichnogo proteza. Kvintjessencija (stomat. ezhegodnik). 1992: 95–100.
7. Bogatov A. I. Modificirovannyj sposob replantacii zubov. Sbornik statej I mezhdunarodnogo kongressa po problemam zubnoj transplantologii. Ufa. 1994: 40–2.
8. Bogatov A. I. Replantacija zubov. Sbornik statej V s"ezda stomatologicheskoi associacii Rossii. Moskva. 1999: 226–7.
9. Sekletov G. A. Osobennosti podgotovki zuba k replantacii pri polnom vyvihe zuba. Stomatologija. 2008; 87 (1): 83–4.
10. Mitrofanov V. I. Replantacija — za i protiv. Klinicheskij sluchaj replantacii kornja, razrushennogo i vosstanovlennogo kul'tevoj vkladkoj, s cel'ju sohraneniya mostovidnoj konstrukcii, vključajushhej problemnyj zub, v oblasti kotorogo vznik svishhevoj hod. Jendodontija Today. 2010; 4: 39–41.
11. Gioeva Ju. A., Matveeva M. N. Autogennaja transplantacija zubov. Ortodontija. 2010; 1 (49): 44–52.
12. Mihajlova E. V. Odnomomentnaja replantacija retinirovannogo zuba pri ortodonticheskoj korrekcii. Ortodont-Info. 1998; 3: 45–6.