

БИОМЕДИЦИНА

Ежеквартальный научный журнал

Издается:

отделением биомедицины
Международной
Экоэнергетической
академии (МЭА) совместно
с отделением биомедицины
Российской академии
естественных наук (РАЕН)

**Журнал БИОМЕДИЦИНА
издается с 2003 года.**

Адрес редакции:

ул. М. Рагима 5, AZ1073,
г. Баку, Азербайджан
Тел: +99412 438 23 70
biomedicine.journal@inbox.ru

Номер государственной
регистрации: АВ 022260

Журнал включен в
международную базу
периодических изданий
Ulrich's Periodicals Directory
и представлен в
полнотекстовом открытом
доступе на официальном
интернет сайте журнала:
<http://www.biomedicine.az>, а
также в онлайн библиотеке
www.cyberleninka.ru

С 2004 года журнал
включен в перечень
изданий, рекомендованных
ВАК при Президенте
Азербайджанской
Республики для публикации
основных научных
результатов диссертаций.

Главный редактор:

Мамедов Мурад Кияс оглы, доктор медицинских наук,
профессор, академик МЭА и РАЕН

Редакционная коллегия:

Агаев И. А., д. м. н., проф., академик МЭА и РАЕН
Алиев Ф. Г., д. т. н., проф., академик МЭА и РААС
Алиева К. А. (зам. ответственного секретаря)
Гудратов Н. О., д. б. н., проф., чл.-корр. МЭА
Дадашева А. Э., д. м. н. (зам. глав. редактора)
Зуев В. А., д. м. н., проф., академик РАЕН (зам. глав. редактора)
Кадырова А. А., д. м. н., проф., чл.-корр. МЭА (зам. глав. редактора)
Малыгин Е. Н., д. м. н., проф., академик МЭА и РАЕН
Пиралиева Е. А. (ответственный секретарь)

Редакционный совет:

Абдуллаева С. Г. (Баку, Азербайджан)
Алиев Д. А. (Баку, Азербайджан)
Амброзайтис А. К. (Вильнюс, Литва)
Анджапаридзе А. Г. (Тбилиси, Грузия)
Атшабар Б. Б. (Алматы, Казахстан)
Боронь-Кочмарски А. (Варшава, Польша)
Гиясбейли С. Р. (Баку, Азербайджан)
Гончарук В. Г. (Монреаль, Канада)
Джавадов С. А. (Сан-Хуан, Пуэрто Рико)
Дробенюк Ж. А. (Атланта, США)
Ершов Ф. И. (Москва, Российская Федерация)
Жаворонок С. В. (Минск, Беларусь)
Керимов А. А. (Баку, Азербайджан)
Кребс Р. (Базель, Швейцария)
Лобзин Ю. В. (Санкт-Петербург, Российская Федерация)
Малинникова Е. Ю. (Москва, Российская Федерация)
Михайлов М. И. (Москва, Российская Федерация)
Мусабаев Э. И. (Ташкент, Узбекистан)
Нордер Х. (Гётеборг, Швеция)
Рагимов А. А. (Москва, Российская Федерация)
Рубинчик С. М. (Лондон, Великобритания)
Садыхова Ф. Э. (Баку, Азербайджан)
Семененко Т. А. (Москва, Российская Федерация)
Тулегенова А. У. (Алматы, Казахстан)
Чобанов Р. Э. (Баку, Азербайджан)

ISSN 1815-3917

BIOMEDICINE

Quarterly Scientific Journal

Publishers:

Department of Biomedicine,
International Ecoenergy
Academy (IEA) and
Department of Biomedicine,
Russian Academy of Natural
Sciences (RANS)

**BIOMEDICINE Journal is
published since 2003.**

Editorial address:

M.Rahim str. 5, AZ1073,
Baku, Azerbaijan
Tel: +99412 438 23 70
biomedicine.journal@inbox.ru

State registration number:
AB 022260

BIOMEDICINE Journal is
included to the Ulrich's
Periodicals Directory.
Full text articles available on
official web-site:
<http://www.biomedicine.az>
and at the online library:
www.cyberleninka.ru

Editor in Chief:

Murad K. Mamedov, Doctor of Medical Sciences, Professor,
Member of IEA and RANS

Editorial Board:

Agayev I.A. , Doct. Med. Sc., Prof., Member of IEA and RANS
Aliyev F.G., Doct. Tech. Sc., Prof., Member of IEA and RAAC
Aliyeva K.A. (Deputy Executive Secretary)
Gudratov N.O., Doct. Biol. Sc., Prof., Corr.-Member of IEA
Dadasheva A.E., Doct. Med. Sc. (Deputy Editor in Chief)
Zuev V.A., Doct. Med. Sc., Prof., Member of RANS (Deputy Editor in
Chief)
Kadyrova A.A., Doct. Med. Sc., Prof., Corr.-Member of IEA (Deputy
Editor in Chief)
Malygin E.N., Doct. Med. Sc., Prof., Member of IEA and RANS
Piraliyeva Y.A. (Executive Secretary)

Editorial Council:

Sevda G. Abdullayeva (Baku, Azerbaijan)
Jamil A. Aliyev (Baku, Azerbaijan)
Arvydas K. Ambrozaitis (Vilnius, Lithuania)
Alexander G. Andjaparidze (Tbilisi, Georgia)
Bakyt B. Atshabar (Almaty, Kazakhstan)
Anna Boron-Koczmarska (Warsaw, Poland)
Sevinj R. Giyasbeyli (Baku, Azerbaijan)
Vladimir G. Goncharuk (Montreal, Canada)
Sabzali A. Javadov (St Juan, Puerto Rico)
Jan A. Drobenuk (Atlanta, USA)
Felix I. Yershov (Moscow, Russian Federation)
Sergey V. Javoronok (Minsk, Belarus)
Azer A. Kerimov (Baku, Azerbaijan)
Roland Krebs (Basel, Switzerland)
Yuri V. Lobzin (Saint Petersburg, Russian Federation)
Elena Y. Malinnikova (Moscow, Russian Federation)
Mikhail M. Mikhailov (Moscow, Russian Federation)
Erkin I. Musabayev (Tashkent, Uzbekistan)
Helene Norder (Gothenburg, Sweden)
Aliheydar A. Ragimov (Moscow, Russian Federation)
Sona M. Rubinchik (London, United Kingdom)
Farkhanda E. Sadykhova (Baku, Azerbaijan)
Tatyana A. Semenenko (Moscow, Russian Federation)
Ardak U. Tulegenova (Almaty, Kazakhstan)
Rafiq E. Chobanov (Baku, Azerbaijan)

Vol.18•N°3•2020

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры и проблемные статьи

- Джафарова К.А., Джафаров Э.М.
Роль микробиоты в иммунитете и воспалении.....4

Оригинальные статьи

- Гусейнов Р.М., Джавадов С.С., Кадырова А.А., Боздоган Б.,
Аскерова Ш.М., Тагиев Б.Т., Каралты И., Байрамов А.Г.
Азол- и амфотерицин В-резистентные штаммы
Aspergillus fumigatus, изолированные из
клинических материалов.....10

- Гулиева Г.А., Аскарлова Г.М., Маггеррамов А.М.,
Байрамов М.Р., Агаева М.А.
Исследование бактерицидных и противогрибковых
свойств новых пиридиниевых производных на
основе фенольных оснований Манниха.....16

История биомедицины

- Рубинчик С.М., Дадашева А.Э., Мамедов М.К.
К 90-летию со дня рождения Джун Алмейда /
Джун Алмейда и ее вклад в развитие медицинской
вирусологии.....21

- Мамедов М.К., Дадашева А.Э.
К 65-ти летию открытия диагностической значимости
активности сывороточных аминотрансфераз при
патологии печени / Успехи лабораторной и
инструментальной диагностики как прямые
стимулы развития клинической гепатологии.....29

- Мамедов М.К., Михайлов М.И.
К 50-ти летию завершения периода эмпирического
изучения этиологии вирусных гепатитов /
Сол Кругман: эпидемиологические наблюдения
и первые образцы вирусов гепатита А и В.....37

- Хроника.....42

CONTENTS

Reviews and problematic articles

- Jafarova K.A., Jafarov E.M.
Role of the Microbiota in Immunity and inflammation.....4

Original articles

- Huseynov R.M., Javadov S.S., Kadyrova A.A., Bozdogan B.,
Askarova S.M., Tagiyev B.T., Karalti I., Bayramov A.G.
Azole- and amphotericin B-resistant strains of
Aspergillus fumigatus isolated from clinical
materials.....10

- Guliyeva G.A., Askarova G.M., Maharramov A.M.,
Bayramov M.R., Agayeva M.A.
Research of bactericidal and antifungal properties of
new pyridium derivatives based on Mannich
phenolic bases.....16

History of biomedicine

- Rubinchik S., Dadasheva A.E., Mamedov M.K.
To the 90th anniversary of the birth of June Almeida /
June Almeida and her contribution to medical
virology development.....21

- Mamedov M.K., Dadasheva A.E.
To the 65th anniversary of the discovery of diagnostic
significance of serum aminotransferases activity in liver
pathology / Successes of laboratory and tool-making
diagnostic as a stimulus of clinical hepatology
development.....29

- Mamedov M.K., Mikhailov M.I.
To the 50th anniversary of the completion of period of
empirical studying the etiology of viral hepatitis /
Saul Krugman: epidemiological observations and
first specimens of hepatitis A and B viruses.....37

- Chronicle.....42

ОБЗОРЫ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11811

Роль микробиоты в иммунитете и воспалении

К.А.Джафарова, Э.М.Джафаров

Азербайджанский медицинский университет, г.Баку, Азербайджан

Резюме: Микробиота играет фундаментальную роль в стимуляции, обучении и функционировании иммунной системы хозяина. В свою очередь, иммунная система в значительной степени эволюционировала как средство поддержания симбиотической связи хозяина с этими очень разнообразными и эволюционирующими микробами. При оптимальной работе этот альянс иммунной системы с микробиотой позволяет индуцировать защитные ответы на патогены и поддерживать регуляторные пути, участвующие в поддержании толерантности к безвредным антигенам. Тем не менее, в странах с высоким уровнем дохода чрезмерное использование антибиотиков, изменения в рационе питания и элиминация нематод, привела к селекции микробиоты, которой не хватает устойчивости и разнообразия, необходимых для сбалансированного иммунного ответа. Этим явление связывают с резким ростом числа аутоиммунных и воспалительных расстройств в тех частях мира, где наши симбиотические отношения с микробиотой были наиболее затронуты.

Ключевые слова: кишечные инфекции, микробиота, иммунитет, воспаление.

Для цитирования: Джафарова К.А., Джафаров Э.М. Роль микробиоты в иммунитете и воспалении. Биомедицина (Баку). 2020;18(3):4-9. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11811

Поступила в редакцию: 10.06.2020. Принята в печать: 28.08.2020.

Role of the Microbiota in Immunity and inflammation

Jafarova K.A., Jafarov E.M.

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Abstract: The microbiota plays a fundamental role on the induction, training and function of the host immune system. In return, the immune system has largely evolved as a means to maintain the symbiotic relationship of the host with these highly diverse and evolving microbes. When operating optimally this immune system-microbiota alliance allows the induction of protective responses to pathogens and the maintenance of regulatory pathways involved in the maintenance of tolerance to innocuous antigens. However, in high-income countries overuse of antibiotics, changes in diet, and elimination of nematodes has selected for a microbiota that lack the resilience and diversity required to establish balanced immune responses. This phenomenon is proposed to account for some of the dramatic rise in autoimmune and inflammatory disorders in parts of the world where our symbiotic relationship with the microbiota has been the most affected.

Key words: intestinal infections, microbiota, immunity, inflammation

For citation: Jafarova K.A., Jafarov E.M. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. Biomedicine (Baku). 2020;18(3): 4-9. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11811

Received: 10.06.2020. Accepted: 28.08.2020..

Для корреспонденции:

К.Э.Джафарова

Доктор философии по медицине, кафедра инфекционных болезней, Азербайджанский медицинский университет, г. Баку, Азербайджан

E-mail: infeksiyakonul@gmail.com

Corresponding author:

Jafarova K.E.

PhD in Medicine, Infection Diseases Chair, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

E-mail: infeksiyakonul@gmail.com

Кишечный гомеостаз поддерживается множественными взаимодействиями между микробиотой, кишечным эпителием и иммунной системой организма [1]. Поскольку желудочно-кишечный тракт населен более чем 100 триллионами микроорганизмов, которые поддерживают симбиотические отношения, поддержка иммунной системы слизистой оболочки, например функциональное состояние лимфоцитов, макрофагов и другие клетки имеет большое значение [2].

Несмотря на неприязненную среду желудочно-кишечного тракта (низкий pH, присутствие пищеварительных ферментов и детергентная активность солей желчных кислот), этот анатомический участок остается основным путем проникновения многочисленных патогенов. Несколько компонентов необходимы для поддержания стабильной среды, такие как физические барьеры, включая эпителиальные клетки (ЭК), прочно соединенные белками плотных соединений [3]. Противомикробные пептиды, такие как дефенсины, продуцируемые ЭК и клетками Панета, создают еще один барьер для защиты [4]. Наконец, наличие ассоциированной с кишечной лимфоидной системы, которая состоит из нескольких различных организованных лимфоидных структур, защищает организм от вторжения патогенов [5].

Иммунная система состоит из сложной сети врожденных и адаптивных компонентов, наделенных исключительной способностью адаптироваться и реагировать на самые разные проблемы. В совокупности эта клеточная сеть действует как грозный регулятор гомеостаза организма, позволяя поддерживать и восстанавливать функцию тканей в контексте микробных и экологических контактов. Развитие определенных ветвей иммунной системы и, в частности, тех, которые связаны с адаптивным иммунитетом, совпало с приобретением сложной микробиоты, подтверждающей концепцию, что большая часть этого механизма эволюционировала как средство для поддержания симбиотических отношений с этими высокоразвитыми организмами. разнообразные микробные сообщества. В свою очередь микробиота поддерживает и регулирует все аспекты иммунной системы.

При оптимальном функционировании альянс иммунной системы и микробиоты переплетает врожденные и адаптивные ветви иммунитета, который выбирает, калибрует и прекращает ответы наиболее подходящим образом. Однако и приобретение сложной иммунной системы, и ее зависимость от микробиоты имели свою цену. Патологии, которые все чаще поражают людей, такие как аллергии, аутоиммунные и воспалительные забо-

левания, возникают из-за неспособности контролировать неверно направленные иммунные ответы на собственные антигены, антигены, полученные из микробиоты или окружающей среды. Кроме того, изменение состава и функции микробиоты в результате использования антибиотиков, эволюции диеты и недавнего устранения таких основных партнеров, как гельминтозы, превратило наших микробных союзников в потенциальную ответственность. Хотя представителей микробиоты часто называют комменсалами, симбиоз - постоянное взаимодействие - между микробиотой и ее млекопитающим-организмом включает в себя различные формы отношений, включая мутуалистические, паразитические или комменсальные. Однако то, как определенные члены микробиоты взаимодействуют со своим организмом, может сильно зависеть от контекста, когда тот же микроб развивается как мутуалист или паразит, в зависимости от питания, сопутствующей инфекции или генетического ландшафта своего организма. За последнее десятилетие исследование оптимальных и нерегулируемых партнерских отношений между микробиотой и ее млекопитающим-организмом заняло центральное место в области иммунологии и привело к повторному открытию более целостного взгляда на физиологию организма. Действительно, представление о том, что микробные партнеры могут способствовать здоровью человека, возникло не недавно и было первоначально предложено в основополагающей работе Додерлейна (1892) и его понимании роли лактобацилл как привратников вагинальной экосистемы, а также наблюдениями Мечникова связывая долгую жизнь с кисломо-лочными продуктами. Недавние попытки секвенирования мета-генома человека изменили наше понимание микробиома и того, как вариации в этих популяциях могут способствовать возникновению болезненных состояний.

Комменсалы также способствуют постнатальному развитию иммунной системы, что, в свою очередь, способствует их сдерживанию. Исследования, проведенные на животных, выращенных в отсутствие живых микробов, называемых стерильными (GF), показали, что микробиота играет решающую роль в развитии вторичных и лимфоидных структур. Этот эффект особенно очевиден в желудочно-кишечном тракте с меньшим размером пятна Пейера и уменьшенным количеством CD4 + Т-клеток и плазматических клеток, продуцирующих IgA [6]. В кишечнике третичные лимфоидные структуры, такие как изолированный лимфоидный фолликул или криптотатчи, индуцируются после рождения в результате воздействия комменсалов

[7]. Как обсуждается ниже, комменсалы также могут вносить вклад в укрепление кишечного барьера с помощью различных механизмов, включая стимулирование созревания эпителиальных клеток и ангиогенез [8].

При правильной работе высокорегулирующий тонус иммунной системы новорожденного и действие комменсалов в развитии и обучении этой системы приводят к установлению прочных и гомеостатических отношений хозяин / комменсал. Эти первичные контакты между иммунной системой хозяина и микробиотой имеют глубокие и долгосрочные последствия для здоровья человека. Действительно, эпидемиологические наблюдения показали, что изменение микробиоты у матерей или новорожденных может предрасполагать к заболеваниям, связанным с нарушением регуляции барьерных реакций, таким как астма [9].

Важным моментом, который следует учитывать при изучении роли микробиоты в иммунной системе, является то, что патогенность в большинстве случаев является контекстуальным состоянием. В самом деле, способность данного микроба, в том числе микробов, составляющих микробиоту, вызывать или способствовать развитию заболевания в значительной степени зависит от состояния активации хозяина, генетической предрасположенности хозяина и локализации конкретного микроба. Таким образом, механизмы, используемые иммунной системой для поддержания своих взаимоотношений с микробиотой, в значительной степени аналогичны тем, которые используются для сдерживания организмов с патогенным потенциалом.

Огромная часть конститутивной функции иммунной системы направлена на контроль наших взаимоотношений с микробиотой. Таким образом, наибольшее количество иммунных клеток в организме находится в местах, колонизированных комменсалами, таких как кожа или желудочно-кишечный тракт. В свою очередь, чтобы защитить свою экологическую нишу, доминирующее действие здоровой микробиоты на иммунную систему направлено на усиление барьерного иммунитета и, следовательно, на их собственное сдерживание. Центральная стратегия, используемая хозяином для поддержания своих гомеостатических отношений с микробиотой, заключается в минимизации контакта между микроорганизмами и поверхностью эпителиальных клеток, тем самым ограничивая воспаление тканей и микробную транслокацию. В желудочно-кишечном тракте, где проживает наибольшая плотность комменсалов, эта сегрегация достигается за счет комбинированного действия эпителиальных клеток, слизи, IgA, анти-

микробных пептидов и иммунных клеток. В совокупности эти структурные и иммунологические компоненты были названы "брандмауэром слизистой оболочки" [10].

Комменсалы являются критическим и активным индуктором регуляторных реакций. Примечательно, что установление толерантности - активное подавление воспалительных реакций на пищу и другие пероральные антигены - не могло быть индуцировано в отсутствие сигналов, происходящих от кишечной флоры [11]. Хотя иммунологическая толерантность, вероятно, достигается с помощью множественных и дублирующих механизмов, за последние несколько лет Foxp3 регуляторные T (Treg) клетки заняли центральное место в нашем понимании этого процесса. Эти клетки поддерживают как периферический, так и слизистый гомеостаз на протяжении всей жизни хозяина, и нарушение гомеостаза этих клеток приводит к потере оральной толерантности и развитию aberrantных эффекторных ответов в кишечнике [12]. Хотя Foxp3 + Treg может возникать в виде дифференцированных клеток в тимусе, среда желудочно-кишечного тракта является привилегированным местом для индукции Treg-клеток в ответ на пероральные антигены [13]. В настоящее время консенсус заключается в том, что для оптимального поддержания толерантности к комменсальным антигенам и антигенам окружающей среды требуется комбинированный эффект Treg, индуцированного тимически и желудочно-кишечным трактом [12]. Это специализированное свойство кишечника индуцировать Treg можно, по крайней мере частично, объяснить присутствием определенных популяций антигенпрезентирующих клеток, таких как CD103 + CD11b + DC, наделенных способностью продуцировать факторы, участвующие в индукции Treg, такие как цитокин TGF- β и метаболит витамина A ретиноевую кислоту (RA) [13]. Тканеспецифические факторы, такие как витамин A и MUC2, гликопротеин слизи, продуцируемый бокаловидными клетками кишечника, вносят вклад в регуляторную специализацию дендритных клеток слизистой оболочки [14]. Важность этого пути для контроля гомеостаза слизистых оболочек подчеркивается тем фактом, что часть индуцированных Treg в ткани толстой кишки специфична для антигенов, происходящих из комменсальной микробиоты [15]. Индукция Treg-клеток предлагается как один из механизмов действия пробиотиков - определенных бактерий, которые, как известно, приносят пользу здоровью хозяина. Действительно, некоторые из регулирующих эффектов пробиотиков в контексте воспалительных заболеваний и атопической экземы у

новорожденных и младенцев, как полагают, связаны с индукцией или экспансией Treg [16] и манипулирование ДК слизистой оболочки в направлении прорегуляторной функции [17]. Комменсалы могут также контролировать отбор образцов перорального антигена с помощью ДК слизистой оболочки и способствовать индукции резидентных макрофагов *lamina propria*, связанных с локальной экспансией Treg-клеток [18]. Помимо прямого влияния микробиоты на иммунный аппарат, связанный с индукцией оральной толерантности, комменсал-специфический Treg может способствовать переключению класса на IgA антиген-специфическим образом [19], тем самым контролируя взаимоотношения хозяина с микробиотой с помощью множества механизмов.

Первая демонстрация того, что уникальная молекула симбионта может способствовать регуляторным ответам, была предоставлена путем идентификации полисахарида А (ПСА), который продуцируется известным симбионтом человека *Bacteroides fragilis*. *B. fragilis* посредством экспрессии PSA может защитить мышей от экспериментального колита, вызванного *Helicobacter hepaticus*, комменсальной бактерией с патогенным потенциалом. Эта защитная активность была связана со способностью ПСА индуцировать и увеличивать производство Treg-клеток, продуцирующих IL-10 [20]. *B. fragilis* был способен стимулировать функцию и индукцию Treg-клеток посредством взаимодействия микробного PSA с TLR2, экспрессируемым Т-клетками, явление, связанное со способностью этой бактерии также ограничивать ответы Th17 [21]. Обнаружение связи между определенными членами микробиоты и индукцией регуляторных клеток, способных ограничивать воспаление слизистой оболочки и способствовать толерантности, привело к рациональному подходу к идентификации следующего поколения пробиотиков с превосходной способностью индуцировать Treg-клетки. Индукция Treg-клеток не ограничивается *B. fragilis*, поскольку присутствие местных видов *Clostridium* также способствует накоплению Treg-клеток за счет, по крайней мере частично, их способности создавать среду, богатую TGF- β [22]. Следует отметить, что оптимальная индукция Treg в среде толстой кишки зависит от синергетического эффекта консорциума штаммов *Clostridia*, в то время как отдельные виды оказывают умеренное влияние на иммунную систему. Основываясь на фундаментальной роли Treg в поддержании гомеостаза слизистой оболочки, вполне вероятно, что вместо того, чтобы ограничиваться определенными комменсалами, большая часть любой данной

микробиоты или метаболизма микробиоты могла развиваться в пользу этого аспекта регуляторной сети. Действительно, недавние открытия показали, что многие организмы могут увеличивать частоту Treg в толстой кишке [23].

Млекопитающие полагаются на бактерии, чтобы расщепить неперевариваемые пищевые компоненты, такие как волокна. Одним из доминирующих метаболитов, образующихся в результате этого процесса, являются короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA), широко распространенные продукты бактериальной ферментации, высоко обогащенные в среде толстой кишки. Хотя роль SCFA в контроле различных аспектов иммунных ответов была признана давно [24], их связь с функцией лимфоцитов была оценена только недавно. Примечательно, что SCFA и, в частности, бутират регулируют размер и функцию сети регуляторных Т-клеток, способствуя индукции и приспособленности регуляторных Т-клеток в среде толстой кишки. Хорошо известно, что бутират регулирует экспрессию генов эпигенетически путем ингибирования гистоновых деацетилаз (HDACs), и это свойство в настоящее время предлагается в качестве основного механизма для усиления генерации Treg в кишечнике. Действие SCFA, вероятно, является результатом манипулирования различными клетками, участвующими в индукции регуляторных ответов, и действительно, действие SCFA как на Т-клетки, так и на дендритные клетки было связано с этим процессом [25].

Аутоиммунные и воспалительные заболевания, связанные с нарушением регуляции иммунных ответов, резко возросли за последние несколько десятилетий. Область иммунологии находится на захватывающем перекрестке. В последние годы иммунологические исследования эволюционировали от взгляда на иммунную систему, ориентированного на лимфоидную ткань, к пониманию тканевого микроклимата как фундаментального фактора, определяющего иммунные реакции. Эта область исследований привела к интеграции микробиоты как внутреннего регулятора всех иммунных реакций. Сегодня происходит взрыв открытий, связанных с растущим пониманием роли сообществ микробов, ключевых видов бактерий, продуктов или метаболитов, производных от комменсала, и, в частности, связи между некоторыми из этих компонентов и болезненными состояниями у людей. Это дает ученым и клиницистам уникальную возможность разработать комплексное исследование здоровья человека, которое включает экологов, диетологов, генетиков, микробиологов, биохимиков и иммунологов. В этой междисциплинар-

ной области исследований лежит ключ к фундаментальным открытиям, направленным на манипулирование или восстановление определенных

аспектов диалога иммунная система-микробиота с целью улучшения или восстановления здоровья человека.

Литература / References

1. Maloy K.J., Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:298-306. DOI: 10.1038/nature10208.
2. Jarchum I., Pamer E.G. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. *Curr Opin Immunol*. 2011;23:353-360. DOI: 10.1016/j.coi.2011.03.001
3. Kunisawa J., Kurashima Y., Kiyono H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011. DOI: 10.1016/j.addr.2011.07.00 doi: 10.1016/j.addr.2011.07.003
4. Peters B.M., Shirliff M.E., Jabra-Rizk M.A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001067. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001067
5. Fagarasan S., Kawamoto S., Kanagawa O., Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Ann. Rev Immunol*. 2010;28:243-273. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101314
6. Hamada H., Hiroi T., Nishiyama Y., Takahashi H. et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol*. 2002;168:57-64. DOI: 10.4049/jimmunol.168.1.57
7. Ohnmacht C., Marques R., Presley L. et al. Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cellular microbiology*. 2011;13:653-659 DOI: doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01577.x
8. Hooper L.V., Macpherson A.J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews Immunology*. 2010;10:159-16. DOI: <https://www.nature.com/articles/nri2710>
9. Ege M.J., Mayer M., Normand A.C. et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *The New England journal of medicine*. 2011;364:701-709. DOI: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1007302>
10. Macpherson A.J., Slack E., Geuking M.B., McCoy K.D. The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. *Seminars in immunopathology*. 2009;31:145-149 <https://www.researchgate.net/publication/26767803>
11. Weiner H.L., da Cunha A.P., Quintana F., Wu H. Oral tolerance. *Immunological reviews*. 2011;241:241-259. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x
12. Josefowicz S.Z., Niec R.E., Kim H.Y. et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*. 2012a;482:395-399. DOI: 10.1038/nature10772
13. Sun C.M., Hall J.A., Blank R.B. et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204:1775-1785. DOI: 10.1084/jem.20070602
14. Klebanoff C.A., Spencer S.P., Torabi-Parizi P. et al. Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC-derived splenic and intestinal dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;43:1608 DOI: 10.1084/jem.20122508
15. Lathrop S.K., Bloom S.M., Rao S.M. et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*. 2011;478:250-254. DOI: 10.1038/nature10434.
16. Karimi K., Inman M.D., Bienenstock J., Forsythe P. *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:186-193. DOI: 10.1164/rccm.200806-951OC
17. Foligne B., Zoumpopoulou G., Dewulf J. et al. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One*. 2007;2:e313. DOI: 10.1371/journal.pone.0000313.
18. Chieppa M., Rescigno M., Huang A.Y., Germain R.N. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203:2841-2852. DOI: 10.1084/jem.20061884
19. Cong Y., Feng T., Fujihashi K. et al. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2009;106:19256-19261. DOI: 10.1073/pnas.0812681106
20. Ochoa-Reparaz J., Mielcarz D.W., Ditrio L.E. Et al. Central nervous system demyelinating disease pro-

tection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide a expression. J Immunol. 2010a;185:4101-4108. DOI: 10.4049/jimmunol.1001443.

21. Round J.L., Lee S.M., Li J. et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. Science. 2011;332:974-977. DOI: 10.1126/science.1206095

22. Atarashi K., Tanoue T., Oshima K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. Nature. 2013;500:232-236. DOI: 10.1038/nature1233

23. Faith J.J., Ahern P.P., Ridaura V.K. et al. Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. Sci Transl Med. 2014;6:220ra211. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008051.

24. Meijer K., de Vos P., Priebe M.G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2010;13:715-721. DOI: 10.1097/MCO.0b013e32833eebe5.

25. Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature. 2013;504(7480):446-50. DOI: 10.1038/nature12721

Информация о соавторах:

Э.М.Джафаров

Кафедра детских болезней, Азербайджанский медицинский университет, г. Баку, Азербайджан

Information about co-authors:

Jafarov E.M.

Childhood Diseases Chair, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11812

Азол- и амфотерицин В-резистентные штаммы *Aspergillus fumigatus*, изолированные из клинических материалов**Р.М.Гусейнов¹, С.С.Джавадов¹, А.А.Кадырова¹, Б.Боздоган⁴,
Ш.М.Аскерова², Б.Т.Тагиев³, И.Каралты³, А.Г.Байрамов¹**¹Азербайджанский медицинский университет, г.Баку, Азербайджан; ²Научно-исследовательский институт легочных заболеваний, г. Баку, Азербайджан; ³Учебно-терапевтическая клиника Азербайджанского медицинского университета, г. Баку, Азербайджан; ⁴Центр рекомбинантной ДНК и рекомбинантного протеина (REDPROM), Университет имени Аднан Мендереса, г. Айдын, Турция

Резюме: В последние годы в результате увеличения числа азол-резистентных штаммов лечение аспергиллезов существенно осложнилось. Целью данного исследования являлось выявление азоловой резистентности среди штаммов *A.fumigatus*, изолированных из клинических образцов пациентов, обратившихся в лечебные учреждения Азербайджанской Республики. Идентификация штаммов *A.fumigatus* проводилась на основе культуральных, морфологических признаков, а также молекулярно-генетическим методом с использованием внутренних транскрибируемых спейсерных регионов 1 и 4. Все штаммы были протестированы на чувствительность к вориконазолу, посаконазолу и амфотерицину В в соответствии с рекомендациями EUCAST. 9 из 10 клинических изолятов были резистентны к посаконазолу, 2 из которых были также резистентны к вориконазолу. 4 штамма были резистентны к посаконазолу и амфотерицину В. В результате исследования были выявлены высокий показатель резистентности (90%) среди клинических штаммов. Для более полной картины исследования должны быть продолжены на больших количествах штаммов с последующим молекулярно-генетическим анализом с целью выявления генов резистентности.

Ключевые слова: *Aspergillus fumigatus*, азоловая резистентность

Для цитирования: Гусейнов Р.М., Джавадов С.С., Кадырова А.А., Боздоган Б., Аскерова Ш.М., Тагиев Б.Т., Каралты И., Байрамов А.Г. Азол- и амфотерицин В-резистентные штаммы *Aspergillus fumigatus*, изолированные из клинических материалов. Биомедицина (Баку). 2020;18(3):10-15. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11812

Поступила в редакцию: 15.06.2020. Принята в печать: 28.08.2020.

Azole- and amphotericin B-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical materials**Huseynov R.M.¹, Javadov S.S.¹, Kadyrova A.A.¹, Bozdogan B.⁴,
Askarova S.M.², Tagiyev B.T.³, Karalti I.³, Bayramov A.G.¹**¹Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan; ²Scientific Research Institute of Lung Diseases, Baku, Azerbaijan; ³Educational-Therapeutic Clinic of Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan; ⁴Recombinant DNA and Recombinant Protein Center (REDPROM), Adnan Menderes University, Aydin, Turkey

Abstract: Recently, emergence of azole resistant strains challenged management of patients with aspergillosis. The aim of investigation was detection of azole resistant *A.fumigatus* strains in clinic specimens of patients applied to hospitals of Azerbaijan Republic. Identification of strains was performed on basis of cultural, morphological features with subsequent molecular genetic analysis of internal transcribing spacer regions 1 and 4. All strains were tested for susceptibility to voriconazole, posaconazole and amphotericin B in accordance to EUCAST guidelines. 9 strains out of 10 were resistant to posaconazole, 2 of which were also resistant to voriconazole. 4 strains were resistant to posaconazole and amphotericin B. Results of our investigation revealed high rate of resistance (90%) in clinic isolates. Investigation on high number of isolates with subsequent molecular genetic analysis of resistance mechanisms is needed.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, azole resistance.

For citation: Huseynov R.M., Javadov S.S., Kadyrova A.A., Bozdogan B., Askarova S.M., Tagiyev B.T., Karalti I., Bayramov A.G. Azole- and amphotericin B-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical materials. Biomedicine (Baku). 2020; 18(3):10-15. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11812

Received: 15.06.2020. Accepted: 28.08.2020.

Для корреспонденции:

Р.М.Гусейнов

Докторант кафедры Медицинской Микробиологии и Иммунологии, Азербайджанский Медицинский Университет, Баку, Азербайджан. E-mail: rav.huseyn@gmail.com

Corresponding author:

Huseynov R.M.

Doctoral student, The department of Medical Microbiology and Immunology, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan E-mail: rav.huseyn@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ. *Aspergillus fumigatus* - плесневый грибок, распространенный повсеместно и образующий большое количество спор, которые могут попасть в нижние дыхательные пути человека. Споры, попавшие в альвеолы, быстро ликвидируются иммунной системой здорового индивидуума [1]. Однако, у пациентов с иммуносупрессией или же с хроническими структурными заболеваниями легких, данные грибки могут вызвать спектр заболеваний, включая хронический легочный аспергиллез (ХЛА) и инвазивный аспергиллез (ИА) [2]. В лечении аспергиллезов применяются азоловые препараты: итраконазол, вориконазол, посаконазол и исавуконазол [3]. Азолы, воздействуя на фермент 14 α -деметилазу, кодируемый геном *cyp51*, блокируют синтез эргостерола - компонента клеточной стенки. Это приводит к накоплению в клетке токсических метилированных стеролов и ее гибели [4].

К сожалению, в последние годы лечение инфекций, вызванных *A.fumigatus*, осложнилось с возникновением и распространением резистентности к азоловым препаратам [5]. Различные исследования показали варьирующую в пределах 50 - 100% смертность пациентов с азол-резистентными штаммами. Исследования, проводившие сравнительную характеристику смертностей от чувствительных и резистентных штаммов, выявили, что смертность от резистентных штаммов выше на 23% - 31% [1].

Целью данного исследования являлось выявление азоловой резистентности среди штаммов *A.fumigatus*, изолированных из клинических образцов пациентов, обратившихся в лечебные учреждения Азербайджанской Республики.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В период 2017-2019 годов были собраны клинические материалы пациентов, обратившихся в Научно-Исследовательскую Клиническую Микробиологическую Лабораторию, Учебно-Терапевтическую Клинику Азербайджанского Медицинского Университета и Научно-Исследовательский Институт Легочных Заболеваний Азербайджанской Республики.

Полученные образцы были инокулированы в 2 чашки Петри с агаром Сабуро с хлорамфениколом (0.5 г/л) (*Pronadisa*, Испания) и инкубированы при температуре 37°C в течение 7 дней [6]. Из колоний, характерных для *Aspergillus spp.*, были приготовлены нативные препараты с окрашиванием лактофенолом хлопковым голубым [7]. Морфологическая идентификация была проведена с использованием таксономических ключей и руководств [6, 8]. Все изоляты, фенотипически идентифицирован-

ные как комплекс *A.fumigatus*, были инкубированы при 48°C для исключения криптоических видов [9] и далее идентифицированы с использованием внутренних транскрибируемых спейсерных регионов 1 и 4 (*ITS1* и *ITS4*) [6, 10].

Молекулярная идентификация штаммов и тест на чувствительность к антифунгальным препаратам проводились в Центре Рекомбинантной ДНК и Рекомбинантного Протеина (*REDPROM*) Университета имени Аднан Мендереса (Турция). Для этого изоляты *Aspergillus spp.* инкубировались в течение 5-7 дней для получения роста, достаточного для экстракции ДНК. Далее готовилась суспензия спор в 1 мл физиологического раствора и центрифугировалась в течение 5 минут при 12000 г $\times$. Супернатант удалялся, а к оставшемуся осадку добавлялось 100 мкл буфера ДНК-экстракции (1M Трис HCl [pH 7.5], *IGEPAL*[®] CA-630, Твин 20, протеиназа K [10 мг/мл]). Микроцентрифужные пробирки, содержащие данную смесь спор и буфера ДНК-экстракции, были инкубированы 30 минут при 56°C с последующим нагреванием до 100°C на 8 минут. Два олигонуклеотидных праймера *ITS 1* и *ITS 4* были использованы для амплификации (*ITS 1*, 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; *ITS 4*, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3') (*Metabion International*, *Martinsried*, Германия). 2 μ l из каждого тестируемого образца было добавлено в Master Mix Раствор (2.5 U Taq-полимеразы (*Fermentas*), 10X Taq буфера (100 mM Трис-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0.4 pmol праймеров, 0.2 mM dNTP, в конечном объеме 30 μ L. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была проведена на термальном циклере *Applied Biosystems SimpliAmp*. Было проведено 35 циклов амплификации, состоящих из фазы денатурации (95°C - 30 сек), отжига (50°C - 30 сек), элонгации (72°C - 1 мин), и финальной элонгации при 72°C на 8 мин. Полученные ампликоны были разделены электрофорезом в агарозном геле с последующей секвенацией (*Macrogen*, <http://dna.macrogen.com/eng/>). Последовательности были сравнены с банком генов (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) и идентифицированы на основе гомологии последовательностей [11].

Тест на чувствительность к антифунгальным препаратам. Все штаммы *A.fumigatus* были протестированы на чувствительность к вориконазолу, посаконазолу и амфотерицину Б в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST*)¹. Каждый антифунгальный агент был разведен в среде RPMI 1640 с 2% глюкозой и добавлен в количестве 100 μ l в микродiluционные лунки. Для приготовления инокулята использовались споры 2-5-дневной культуры на агаре Сабуро, из которых готовилась суспензия в стерильной воде с Твином 20 (1%). Концентрация спор в суспензиях с использованием гемо-

¹EUCAST definitive document E.DEF9.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. January 2017. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing_definitive.pdf.

Таблица. Антифунгальная чувствительность 10 клинических штаммов *A.fumigatus* к 3 препаратам (ВОР - вориконазол, ПОС - посаконазол, АМБ - амфотерицин Б)

Изолят	Клинический материал	МИК (мг/л ⁻¹)		
		ВОР	ПОС	АМБ
30с	Мокрота	1	0,5	2
47с	Мокрота	0,5	0,25	2
52с	Мокрота	4	1	1
53с	Мокрота	0,5	1	2
68с	Мокрота	4	1	1
71с	Мокрота	2	1	4
92с	Мокрота	0,25	1	2
109с	Мокрота	2	1	2
136с	Мокрота	0,5	1	4
137с	Мокрота	0,5	1	4

цитометра доводилась до $2-5 \times 10^6$ конидий/мл. 10-кратным разведением получалась конечная концентрация в $2-5 \times 10^5$ конидий/мл. В микродилюционные лунки, содержащие антифунгальные препараты, добавлялось по 100 μ л инокулума с дальнейшей инкубацией 37°C в течение 48 часов. Минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) считалась та, при которой не наблюдалось визуального роста грибка в питательной среде. Изоляты с МИК для вориконазола и амфотерицина Б ≥ 4 мг/л и для посаконазола ≥ 0.5 мг/л считались резистентными².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Было изолировано 10 штаммов из клинических образцов. Все штаммы были изолированы у пациентов, обратившихся в клинику города Баку. Результаты теста на антифунгальную чувствительность полученных штаммов отображены в таблице.

9 из 10 штаммов были резистентны к посаконазолу (МИК от 0,5 до ≥ 1 мг/л⁻¹), из которых 2 изолята (52с и 68с) были также резистентны к вориконазолу (МИК=4 мг/л⁻¹). 4 штамма были резистентны к посаконазолу и амфотерицину Б, среди которых 1(71с) был среднечувствителен к вориконазолу (МИК=2 мг/л⁻¹).

Азолы не являются мутагенами, но способствуют селекции мутировавших штаммов [12]. При бесполом размножении, изобилиующим в природе, образуется большое количество спор, среди которых в единичных количествах могут происходить спонтанные мутации. Данные мутантные штаммы, обладая более высокой способностью к выживанию, под воздействием стресс-факторов получают преимущество над "дикими" немутантными. В результате, при наличии стресс-фактора, в популяции происходит увеличение числа мутан-

тных штаммов [1]. Известно 2 возможных условия селекции: длительное лечение больных азолами и содержание азолов в большом количестве в окружающей среде. Мутантные штаммы могут приобрести отличительные фенотипические свойства: слабые по сравнению с нормальными штаммами темп роста и споруляцию [12]. При длительном лечении азолами часто развиваются точечные мутации (G54, P216, F219, M220, G138, Y431, G44), влекущие изменения в каналах, через которые азолы проходят в клетку-мишень [13]. Под воздействием же азолов, применяемых в окружающей среде, происходит образование tandemных повторов (TR) в промотерном регионе в сочетании с точечными мутациями гена *sur51* [14]. Примерами таких мутаций являются TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A, TR53 и TR53/L98H [15].

При этом часто фенотип резистентности зависит от типа мутации. Так, G54 мутанты обладают резистентностью к итраконазолу и посаконазолу и чувствительны к вориконазолу и исаваконазолу. Штаммы, резистентные к вориконазолу, резистентны также и к исаваконазолу. TR34- изоляты резистентны к итраконазолу (≥ 16 мг/л⁻¹), TR46-изоляты - к вориконазолу [12].

Согласно рекомендации Европейского общества клинической микробиологии и инфекционных заболеваний (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - ESCMID) в сотрудничестве с Европейской конфедерацией медицинской микологии (European Confederation of Medical Mycology - ECMM) и Европейским респираторным обществом (European Respiratory Society - ERS) [3], для изолятов *Aspergillus* следует прово-

²European committee on antimicrobial susceptibility testing. Antifungal agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. 2018. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing_definitive.pdf

дить идентификацию на уровне раздела. При лечении в качестве препаратов первой линии рекомендуются вориконазол или исавуконазол. Посаконазол рекомендован для профилактики аспергиллеза у пациентов с острым миелолейкозом и миелодиспластическим синдромом [3]. Лечение комбинацией препаратов не рекомендуется. В регионах с высокой распространенностью азол-резистентных штаммов в окружающей среде ($\geq 10\%$) международная экспертная панель рекомендует комбинацию азол-эхинокандин или липосомальный амфотерицин Б как первичную терапию. При установлении наличия азоловой резистентности у штамма, изолированного у пациента, рекомендуется замена монотерапии азолом на липосомальный амфотерицин Б. Из вышесказанного следует, что в зависимости от уровня резистентности стратегия лечения больных аспергиллезами существенно отличается. В зонах с низким показателем резистентности ($\leq 10\%$) проблемным считается предотвращение летальных исходов пациентов в спорадических случаях аспергиллезов, вызванных резистентными штаммами, так как рутинное проведение тестов для определения резистентных штаммов осуществляется очень малым количеством лабораторий [1]. Таким образом, определение эпидемиологии резистентности в локальном масштабе имеет важное значение при выработке стратегии лечения в определенной стране.

На сегодняшний день случаи азоловой резистентности были зафиксированы в большинстве европейских стран. По данным сети Европейского сотрудничества по эпидемиологическому надзору за *Aspergillus* резистентностью (Surveillance Collaboration on *Aspergillus* Resistance in Europe - SCARE), включающего 22 медицинских центра в 19 странах, частота резистентности составила 3.2% [16]. Следует учитывать тот факт, что распространенность резистентности значительно варьирует как между странами, так и между различными медицинскими учреждениями и различными группами пациентов в одном медицинском учреждении [17, 18].

Недавно проведенное генетическое исследование, изучившее 2026 изолятов из 13 стран, выявило 6% показатель распространенности резистентности [19]. Примечательно, что большинство выявленных как в Европе, так и в Азии штаммов имеют одинаковые механизмы резистентности, в частности TR34/L98H и TR46/Y121F/T289A мутации, которые, как считается, берут свое начало из окру-

жающей среды. В то же время, в штаммах, выявленных в США, данные механизмы встречаются нечасто. Считается, что такое различие в генотипе резистентности связано с различным количеством применяемых азоловых фунгицидов в аграрной промышленности в Европе и США. По данным van der Linden JW и др. [20], штаммы с мутацией TR34/L98H ассоциированы с высоким летальным исходом (89%) при аспергиллезах. По результатам того же исследования, распространенность азол-резистентных штаммов составила 5,3%, частота же резистентности - 4,6%. Однако, данная цифра варьировала в зависимости от медицинского центра, достигая 9,5%. Схожий плохой прогноз ассоциирован с TR46/Y121F/T289A мутацией [21].

Наше исследование выявило резистентность к посаконазолу у 9 (90%) из 10 клинических штаммов, из которых 2 также были резистентны к вориконазолу. Так как тип мутации имеет различное влияние на МИК значения вориконазола (G54 точечные мутации не влияют на чувствительность штамма к вориконазолу) [9, 12], возможно, что в изученных клинических изолятах резистентность развилась под воздействием длительной терапии азоловыми препаратами. Однако, наличие у 2-х штаммов (52С и 68с) резистентности к обоим азолам допускает возможность миграции данной резистентности из штаммов окружающей среды.

3 изолята (30%) в нашем исследовании были резистентными к амфотерицину Б ($\text{МИК} > 2 \text{ мг/л}^{-1}$), что свидетельствует о высокой вероятности осложнений при лечении больных. Предыдущие исследования выявили различные показатели распространенности резистентности к амфотерицину Б (0-96%) [22-25]. Самые высокие показатели были зафиксированы в Канаде и Бразилии - со значениями 96% и 27,4% соответственно [22, 23]. Другие исследования, проведенные Espinel-Ingroff A и др. и Dannaoui E и др. выявили низкие значения - 5,6% и 0% соответственно [24, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате исследования 10 клинических штаммов были выявлены высокий показатель резистентности (90%) к азоловым препаратам. 9 штаммов были резистентны к посаконазолу, 2 - к вориконазолу. Возможно, что главной причиной этого является малое количество исследованных изолятов. Для более полной картины исследования должны быть продолжены на больших количествах штаммов с последующим молекулярно-генетическим анализом с целью выявления генотипов резистентности.

Литература / References

1. Lestrade PPA, Meis JF, Melchers WJG, Verweij PE. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(7):799-806. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.11.027.
2. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax.* 2015;70(3):270-7. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206291.
3. Ullmann A.J., Aguado J.M., Arikan-Akdoglu S. et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(Suppl 1):e1-e38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.
4. Scorzoni L., de Paula E.S., Marcos C.M. et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol.* 2017;8:36. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00036.
5. Verweij P.E., Chowdhary A., Melchers W.J., Meis J.F. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin Infect Dis.* 2016;62(3):362-8. DOI: 10.1093/cid/civ885.
6. Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014 Jun;78:141-73. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
7. Leck A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health.* 1999;12(30):24. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1706009/>
8. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol.* 2005;43(Suppl 1):S125-8. DOI: 10.1080/13693780500052222.
9. Riat A., Plojoux J., Gindro K. et al. Azole Resistance of Environmental and Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates from Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(4):e02088-17. DOI: 10.1128/AAC.02088-17.
10. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(16):6241-6. DOI: 10.1073/pnas.1117018109.
11. Oryasin E., Biyik H.H., Basbulbul G, Bozdogan B. Antimicrobial susceptibility patterns of environmental and hospital isolations of enterococci in Aydin. *Turkish Journal of Biology.* 2013;37:514-9. DOI: <https://doi.org/10.3906/biy-1203-3> (In Turkish).
12. Rybak JM, Fortwendel JR, Rogers PD. Emerging threat of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(4):835-842. DOI: 10.1093/jac/dky517.
13. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, et al. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(7):1068-1076. DOI: 10.3201/eid1507.090043.
14. Hollomon D. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? *Pest Manag Sci.* 2017;73(10):1987-1993. DOI: 10.1002/ps.4607.
15. Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL, et al. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016;371(1709):20150460. DOI: 10.1098/rstb.2015.0460.
16. van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(6):1041-1044. doi:10.3201/eid2106.140717
17. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis.* 2017;216(suppl 3):S436-S444. DOI: 10.1093/infdis/jix210.
18. Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Goldman GH. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus Fungi*. *Front Microbiol.* 2016;7:1382. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01382.
19. Ashu EE, Hagen F, Chowdhary A, et al. Global Population Genetic Analysis of *Aspergillus fumigatus*. *mSphere.* 2017;2(1):e00019-17. DOI: 10.1128/mSphere.00019-17
20. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1846-1854. DOI:10.3201/eid1710.110226
21. van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis.* 2013;57(4):513-20. DOI: 10.1093/cid/cit320.
22. Ashu EE, Korfanty GA, Samarasinghe H, et al. Widespread amphotericin B-resistant strains of

- Aspergillus fumigatus* in Hamilton, Canada. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1549-1555. DOI:10.2147/IDR.S170952
23. Reichert-Lima F, Lyra L, Pontes L, et al. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. *Mycoses.* 2018;61(6):360-365. DOI: 10.1111/myc.12759.
24. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5150-5154. DOI:10.1128/AAC.00686-11
25. Dannaoui E, Persat F, Monier MF, et al. In-vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44(4):553-5. DOI: 10.1093/jac/44.4.553.

Информация о соавторах:

С.С.Джавадов

Доктор философии по медицине, доцент, кафедра медицинской микробиологии и иммунологии, Азербайджанский Медицинский Университет, г. Баку, Азербайджан

А.А.Кадырова

Профессор, доктор медицинских наук, зав. кафедрой кафедры медицинской микробиологии и иммунологии, Азербайджанский Медицинский Университет, г. Баку, Азербайджан

Б.Боздоган

Профессор, доктор медицинских наук, зав. Центром Рекombинантной ДНК и Рекombинантного Протеина (REDPROM), Университет имени Аднан Мендереса, г. Айдын, Турция

Ш.М.Аскерова

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт легочных заболеваний, г. Баку, Азербайджан

Б.Т.Тагиев

Врач-лаборант, лаборатория учебно-терапевтической клиники, Азербайджанский Медицинский Университет, г. Баку, Азербайджан

И.Г.Каралты

Зав. лабораторией учебно-терапевтической клиники, Азербайджанский Медицинский Университет, г. Баку, Азербайджан

А.Г.Байрамов

Доктор философии по медицине, доцент, кафедра медицинской микробиологии и иммунологии, Азербайджанский Медицинский Университет, г. Баку, Азербайджан

Information about co-authors:

Javadov S.S.

PhD in Medicine, Docent, Chair of Medical Microbiology and Immunology, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Kadyrova A.A.

Professor, Doctor of Medical Sciences, Head of Medical Microbiology and Immunology Chair, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Bozdogan B.

Professor, Doctor of Medical Sciences, Chief of Recombinant DNA and Recombinant Protein Center (REDPROM), Adnan Menderes University, Aydin, Turkey

Askarova S.M.

PhD in Biology, Leading Researcher, Scientific Research Institute of Lung Diseases, Baku, Azerbaijan

Tagiyev B.T.

Laboratory Physician, Laboratory of Educational Therapeutical Clininc, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Karalti I.

Head of Laboratory, Laboratory of Educational Therapeutical Clininc, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Bayramov A.G.

PhD in Medicine, Docent, Chair of Medical Microbiology and Immunology, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11813

Исследование бактерицидных и противогрибковых свойств новых пиридиновых производных на основе фенольных оснований Манниха

Г.А.Гулиева¹, Г.М.Аскарова², А.М.Маггеррамов², М.Р.Байрамов², М.А.Агаева²¹Республиканская Санитарно-Карантинная Инспекция, г. Баку, Азербайджан;²Бакинский Государственный Университет, г. Баку, Азербайджан

Резюме: Целью исследования было изучение синтезированных соединений с целью определения их чувствительности к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, а также их способности подавлять рост грибковой микрофлоры, диффундирующей с пропитанных ими бумажных дисков в питательную агаровую среду. Исследования проводились по методике: "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам". В работе использовали штаммы культур *S. aureus* ATCC®25923; изоляты *S. aureus* ATCC®25923; *E. coli* ATCC®25922, *C. albicans* ATCC®90028 и *A. niger*, выделенные из питьевой воды и пищевых продуктов. Культуральные среды BD - Mueller Hinton broth, Mueller Hinton agar, Saburo agar, BBLTL Coagulase Mannitol agar, Endo agar. В ходе проведенных исследований выявлены различия в действии морфолинметилфенокситетраметилпиридиния бромида и пиперидинметилфенокситриметилпиридиния бромида на рост и размножение штаммов микроорганизмов *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. niger* а также доказали свои антибактериальные и фунгицидные свойства. Антибактериальная активность при использовании метода серийных разведений начинается с концентрации 0,001 мкг/мл, что является минимальной ингибирующей концентрацией для грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) бактерий.

Ключевые слова: пиридиновые производные, фенольные основания Манниха.

Для цитирования: Гулиева Г.А., Аскарова Г.М., Маггеррамов А.М., Байрамов М.Р., Агаева М.А. Исследование бактерицидных и противогрибковых свойств новых пиридиновых производных на основе фенольных оснований Манниха. Биомедицина (Баку). 2020;18(3):16-20. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11813

Поступила в редакцию: 17.06.2020. Принята в печать: 28.08.2020.

Research of bactericidal and antifungal properties of new pyridium derivatives based on Mannich phenolic bases

Guliyeva G.A.¹, Askarova G.M.², Maharramov A.M.², Bayramov M.R.², Agayeva M.A.²¹Republican Sanitary and Quarantine Inspection, Baku, Azerbaijan;²Baku State University, Baku, Azerbaijan

Abstract: The aim of research was study the synthesized compounds to determine their sensitivity to gram-positive and gram-negative microorganisms, as well as their ability to inhibit the growth of fungal microflora, diffusing from paper disks soaked in them into a nutrient agar medium. The investigations were carried out according to the method: "Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs". The work used the strains of the cultures of *S. aureus* ATCC®25923; *E. coli* ATCC®25922, *C. albicans* ATCC®90028, and *A. niger* mold isolates isolated from drinking water and food. BD culture media - Mueller Hinton broth, Mueller Hinton agar, Saburo agar, BBLTL Coagulase Mannitol agar, Endo agar. In the course of the studies carried out, differences in the effect of morpholinomethyl-phenoxymethylpyridinium bromide and piperidinomethylphenoxymethylpyridinium bromide on the growth and reproduction of strains of microorganisms *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. niger*, and also proved their antibacterial and fungicidal properties. Antibacterial activity by the serial dilution method begins at a concentration of 0.001 mkg/ml, which is the minimum inhibitory concentration for gram-negative (*E. coli*) and gram-positive (*S. aureus*) bacteria.

Key words: pyridium derivatives, Mannich phenolic bases.

For citation: Guliyeva G.A., Askarova G.M., Maharramov A.M., Bayramov M.R., Agayeva M.A. Research of bactericidal and antifungal properties of new pyridium derivatives based on Mannich phenolic bases. Biomedicine (Baku). 2020;18(3):16-20. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11813

Received: 17.06.2020. Accepted: 28.08.2020.

Для корреспонденции:

Г.А.Гулиева

Доктор философии по биологии, зав. отделом микробиологии, Республиканская санитарно-карантинная инспекция, г. Баку, Азербайджан. E-mail: laboratoriyarskm@rambler.ru

Corresponding author:

Guliyeva G.A.

PhD in biology, Head of Microbiology Department, Republican Sanitary and Quarantine Inspection, Baku, Azerbaijan. E-mail: laboratoriyarskm@rambler.ru

Проведение целенаправленных исследований по синтезу новых органических соединений, обладающих биологической активностью, является одним из приоритетных направлений химической науки [1-4].

Несмотря на то, что за последние десятилетия были синтезированы различные соединения с высокой противоопухолевой, антибактериальной и противогрибковой активностью и на их основе даже созданы медицинские препараты, поиск более эффективных веществ, содержащих в структурах фармакофорные группы, в частности, пиридиниевое или хинолиновое кольцо, продолжается [5-8].

Среди подобных веществ особое место занимают производные фенолов, которые по биологическим свойствам, приближаются к модифицированным природным, например, к аминотетраметилфенолам [9].

В настоящей статье приводятся результаты наших исследований по изучению антимикробных и противогрибковых свойств двух соединений: морфолинометил-фенокситетраметилпиридиния бромида и пиперидинометилфенокситриметилпиридиния бромида, структурные формулы которых приведены в рисунке 1.

Соединения были получены тройной конденсацией на основе продуктов: фенола, формальдегида и циклического амина (морфолина и пиперидина соответственно); их реакциями с симметричными C3-C4-дибромалканами и пиридином (по Манниху).

Обе группы синтезируемых соединений - интенсивно окрашенные кристаллические вещества (от ярко желтого до темно красного), хорошо растворимые в воде.

Целью данной работы явилось исследование синтезируемых соединений для определения чувствительности по отношению к грамположительным и к грамотрицательным микроорганиз-

мам, а также их способность угнетать рост грибной микрофлоры, диффундируя из пропитанных ими бумажных дисков в питательную агаризованную среду. Работу проводили по методике: "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам" [10].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В работе использовали штаммы культур *S.aureus* ATCC®25923; *E.coli* ATCC®25922, *C.albicans* ATCC®90028, а также изоляты плесневых грибов *A.niger*, выделенные из питьевой воды и пищевых продуктов. Питательные среды компании BD - Mueller Hinton broth, Mueller Hinton agar, Saburo agar, BBLTL Coagulase Mannitol agar, Endo agar.

На первом этапе исследования антибактериальных свойств синтезируемых соединений использовали метод серийных разведений в жидких средах (или иначе суспензионный метод) позволяющий установить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) препарата для выделенного штамма микроорганизма. Наблюдение вели при различном времени экспозиции: 30 мин, 60 мин, 120 мин, 240 мин. На основании полученных результатов, выраженных в КОЕ/мл, проводилась оценка ингибирующей активности анализируемого препарата. Были приготовлены растворы 100 мкг/мл (без разведения) и в разведениях 1:10 (10 мкг/мл), 1:100 (1 мкг/мл), 1:1000 (0,1 мкг/мл), 1:10000 (0,01 мкг/мл) по отношению к штаммам *E.coli*, *S.aures*, *C.albicans* и *A.niger*.

На втором этапе был использован диско-диффузный метод на селективных средах для каждого возбудителя. Основная навеска 1 мг/мл (1000 мкг), с последующими разведениями (100 мкг, 10 мкг, 1 мкг, 0,1 мкг).

Равные объемы микробной флоры (по 1 мл) наносились на чашки Петри с селективной средой, используя стандартный инокулюм. Приоткрытые чашки подсушивали в боксе при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем в лабораторных условиях готовились стерильные диски с различной концентрацией. Чашки инкубировали в термостате в течение 24 часов при 37°C. Степень чувствительности испытуемого микроорганизма к синтезируемому веществу определяли по ширине задержки роста в мм.

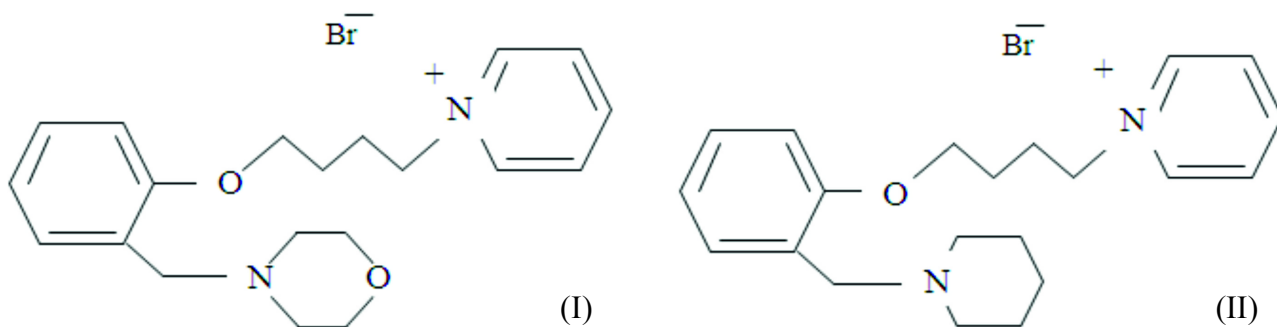


Рис. 1. Структурные формулы морфолинометил-фенокситетраметилпиридиния бромида (I) и пиперидинометилфенокситриметилпиридиния бромида (II)

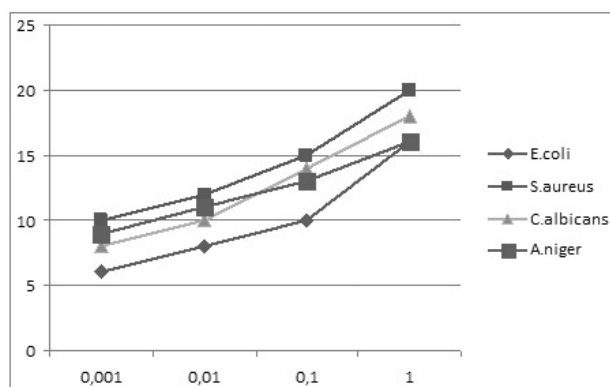


Рис. 2. График биологической активности пробы I

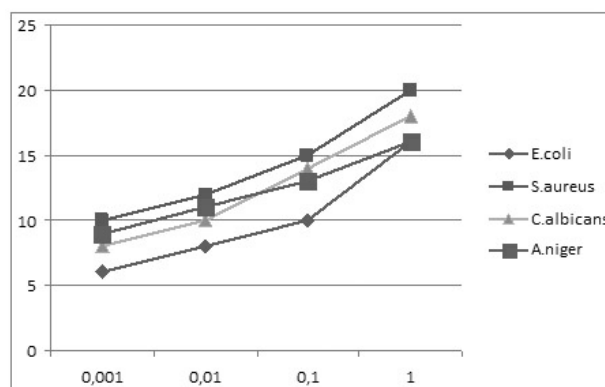


Рис. 3. График биологической активности пробы II

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунках представлены результаты проведенного исследования эффективности синтезируемых проб I и II в разведениях 1:10; 1:100; 1:1000 и 1:10000 по отношению к штаммам *E.coli*, *S.aureus*, *C.albicans* и *A.niger*.

Следует отметить, что наиболее подвержен действию биологической активности синтезируемых проб на *S.aureus* (представитель грамположительных микроорганизмов).

Наблюдаемая тенденция связана из-за различий в строении клеточных стенок грамположительных по сравнению с грамотрицательными бактериями. В клеточной стенке грамположительных бактерий содержится гораздо большее количество пептидогликана и муреина, делающее ее отрицательно заряженной, что в конечном итоге помогает проникновению в клетку соединения.

Рассматривая и анализируя результаты в жидких средах, можно предположить, в что различных разведениях через 120 минут происходила гибель микроорганизма. Эффективность действия по отношению к *S.aureus* в разведении 1:1000 через 120 минут составила 40% от начала контакта, к *E.coli* составила - около 20%, по отношению к *C.albicans* - около 30% от начала контакта, *A.niger* - 35% соответственно. Наблюдался микростатический эффект (т.е. задержка роста числа колоний) по отношению ко всем штаммам исследуемых микроорганизмов. Однако с течением времени все-таки наблюдалось постепенное снижение количества живых клеток, свидетельствующее об ингибирующей активности растворов концентрации 0,01 мкг/мл (рис. 2 и рис. 3).

При проведении последующего разведения (концентрация 0,001 мкг/мл) микроорганизмы *C.albicans* и *A.niger* уже не подавлялись концентрацией вещества, обладающего антибактериальными свойствами: наблюдался микростатический эффект,

проявлявшийся в задержке роста с последующим его возобновлением. Это говорит об устойчивости грибов к данному разведению растворов исследуемых препаратов. Таким образом, проанализировав полученные в ходе исследования данные, сделали вывод, что проявляется антимикробная активность наших соединений, начиная с концентрации 0,001 мкг/мл, которая является минимальной ингибирующей (бактериостатической) концентрацией для грамотрицательных (*E.coli*) и грамположительных (*S.aureus*) бактерий. В отличие от них, штаммы плесневых грибов *A.niger* и дрожжей *C.albicans* более эффективно подавляются концентрацией 0,01 мкг/мл.

На втором этапе для исследования фунгицидных свойств, нами был использован диско-диффузный метод, результаты которого даны в таблицах 1 и 2.

Как видно из таблицы, в обоих соединениях в разведениях 1:1000 (0,001 мг) по отношению к *E.coli* 6-7 мм; по отношению *S.aureus* 8-10 мм (соответственно) показали результат по задержке роста. В разведении 1:100 зона подавления роста, как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов увеличивается и т.д.

Как видно из таблицы в разведении 1:1000 штаммы плесневых грибов *A.niger* и дрожжей *C.albicans* не проявили биологической активности в обоих синтезируемых соединениях.

ВЫВОДЫ. Таким образом, в ходе проведенных исследований выявили различия в воздействии морфолинотетраметил-фенокситетраметилпиридиния бромид (I) и пиперидинотетраметил-фенокситетраметилпиридиния бромид (II) на рост и размножение штаммов микроорганизмов *E.coli*, *S.aureus*, *C.albicans*, *A.niger*, а также доказали их антибактериальные и фунгицидные свойства. Антибактериальная активность методом серийных разведений начинается с концентрации 0,001

Таблица 1. Зона подавления роста микроорганизмов диско-диффузным методом

Соединение Микроорганизмы	Зона подавления роста		Навеска в мг.
	E.coli (г-)	S. aureus (г+)	
Соединение I	16 мм	20 мм	1,0
	10 мм	15 мм	0,1
	8 мм	12 мм	0,01
	6 мм	10 мм	0,001
Соединение II	17 мм	18 мм	1,0
	12 мм	14 мм	0,1
	9 мм	10 мм	0,01
	7 мм	8 мм	0,001

Таблица 2. Фунгицидная активность C.albicans и A.niger диско-диффузным методом

Соединение Микроорганизмы	Зона подавления роста		Навеска в мг.
	C. albicans	A. niger	
Соединение I	18 мм	16 мм	1,0
	14 мм	13 мм	0,1
	10 мм	11 мм	0,01
	-	-	0,001
Соединение II	15 мм	10 мм	1,0
	12 мм	8 мм	0,1
	9 мм	6 мм	0,01
	-	-	0,001

мкг/мл, которая является минимальной ингибирующей концентрацией для грамотрицательных (*E.coli*) и грамположительных (*S.aureus*) бактерий.

На втором этапе для исследования фунгицидных свойств был использован диско-диффузный метод, который показал, что соединение (I) проявило более выраженную чувствительность к плесневым

грибам *A.niger* и дрожжам *C.albicans*, чем соединение (II) при минимальном разведении 0,01 мг/мл, что составило 10-11 мм против 6-9 мм соответственно. Однако в целом какой-либо определенной закономерности между фунгицидным действием и типом синтезируемых соединений не наблюдалось, что и является дальнейшей целью наших исследований.

Литература

1. Yamali C., Tugrak M., Gul H.I., et al. The inhibitory effects of phenolic Mannich bases on carbonic anhydrase I and II isoenzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(6):1678-1681. DOI: 10.3109/14756366.2015.1126715.
2. Babaev E.R. Aminomethyl derivatives of 2, 4-di- α -methylbenzylphenol as multifunctional additives for lubricating oils. *Petroleum Chemistry*. 2006;46(3):206-208. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0965544106030133>
3. Dai J.L., Shao N.Q., Zhang J., et al. Cu(II)-Catalyzed ortho-Selective Aminomethylation of Phenols. *J Am Chem Soc*. 2017;139(36):12390-12393. DOI: 10.1021/jacs.7b06785
4. Nassar E. Synthesis, (in vitro) Antitumor and Antimicrobial Activity of some Pyrazoline, Pyridine, and Pyrimidine Derivatives Linked to Indole Moiety. *Journal of American Science*. 2010;6:338-347. Available at: https://www.jofamerican-science.org/journals/am-sci/am0608/43_3332am0608_338_347.pdf
5. Rezaeivala M., Keypour H. Schiff base and non-Schiff base macrocyclic ligands and complexes incorporating the pyridine moiety - The first 50 years. *Coordination Chemistry Reviews*. 2014;280:203-253. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.06.007.
6. Lu X., Xu C., Wang J., He Y., Hu H. Chiral Camphor-Based 1,3- and 1,4-Amino Alcohols and Aminodiols as Ligands for Diethylzinc Addition to Aldehydes. *Tetrahedron Lett*. 2002;43:8367-8369. DOI: 10.1016/S0040-4039(02)01985-8.
7. Михайлов И.В., Колодина А.А., Душенко Г.А. Синтез и строение 5,7-ди(трет-бутил)-2-(8-метилсульфонилокси-хинолин-2-ил)-1,3-пропанола. ДАН (Россия). 2016;468:652-655. DOI: 10.7868/S086956521618016X
8. Андрияшин В.В., Бахтиярова Ю.Н., Черкасов Р.А. и др. Синтез четвертичных фосфониевых солей на основе фосфорилированных пространственно-затрудненных фенолов. *Журн. орг. хим.* 2012;48(12):1574-1575. DOI:

10.1134/S1070428012120159

9. Мосюров С.Е., Кухарева Т.С., Коротеев М.П., и др. Реакции электрофильного и нуклеофильного замещения в ряду флавоноидов с участием аминокислот и их производных. Доклады АН. 2018;470(4):426-429. DOI: 10.7868/S0869565218160090

10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2. 1890-04. Методические указания. Утверждены Г.Г.Онищенко 04.03.2004 г. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200038583>

References

1. Yamali C., Tugrak M., Gul H.I., et al. The inhibitory effects of phenolic Mannich bases on carbonic anhydrase I and II isoenzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(6):1678-1681. DOI: 10.3109/14756366.2015.1126715.
2. Babaev E.R. Aminomethyl derivatives of 2, 4-di- α -methylbenzylphenol as multifunctional additives for lubricating oils. *Petroleum Chemistry*. 2006;46(3):206-208. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0965544106030133>
3. Dai J.L., Shao N.Q., Zhang J., et al. Cu(II)-Catalyzed ortho-Selective Aminomethylation of Phenols. *J Am Chem Soc*. 2017;139(36):12390-12393. DOI: 10.1021/jacs.7b06785
4. Nassar E. Synthesis, (in vitro) Antitumor and Antimicrobial Activity of some Pyrazoline, Pyridine, and Pyrimidine Derivatives Linked to Indole Moiety. *Journal of American Science*. 2010;6:338-347. Available at: https://www.jofamerican-science.org/journals/am-sci/am0608/43_3332am0608_338_347.pdf
5. Rezaeivala M., Keypour H. Schiff base and non-Schiff base macrocyclic ligands and complexes incorporating the pyridine moiety - The first 50 years. *Coordination Chemistry Reviews*. 2014;280:203-253. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.06.007.
6. Lu X., Xu C., Wang J., He Y., Hu H. Chiral Camphor-Based 1,3- and 1,4-Amino Alcohols and Aminodiol as Ligands for Diethylzinc Addition to Aldehydes. *Tetrahedron Lett*. 2002;43:8367-8369. DOI: 10.1016/S0040-4039(02)01985-8.
7. Mikhailov I.V., Kolodina A.A., Dushenko G.A. Синтез и строение 5,7-ди(трет-бутил)-2-(8-метилсульфонилсикхинол-2-ил)-1,3-трополон. *DAN (Russia)*. 2016;468:652-655. DOI: 10.7868/S086956521618016X. (In Russian).
8. Andriyashin V.V., Bakhtiyarova Yu.V., Cherkasov R.A., et al. Synthesis of Quaternary Phosphonium Salts from Phosphorylated Sterically Hindered Phenols. *Russ. Journal of Organic Chemistry*. 2012;48(12):1574-1575. DOI: 10.1134/S1070428012120159. (In Russian).
9. Mosyurov, S.E., Kukhareva, T.S., Koroteev, M.P. et al. Reactions of Electrophilic and Nucleophilic Substitution in Flavonoid Series Involving Amino Acids and Their Derivatives. *Dokl Chem*. 2018;470(4):426-429. DOI: 10.7868/S0869565218160090. (In Russian).
10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2. 1890-04. Методические указания. Утверждены Онищенко Г.Г. 04.03.2004. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200038583>. (In Russian).

Информация о соавторах:

Г.М.Аскарова

Докторант, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории "Химии алкенилфенолов", Бакинский Государственный Университет, г. Баку, Азербайджан.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8571-2792>

А.М.Магеррамов

Академик, зав. кафедрой "органической химии", Бакинский Государственный Университет, г. Баку, Азербайджан.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1882-7519>

М.Р.Байрамов

Профессор, доктор химических наук, зав. кафедрой "Нефтехимии и химической технологии", Бакинский Государственный Университет, г. Баку, Азербайджан.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1640-3392>

М.А.Агаева

Доктор философии по химии, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории "Химии алкенилфенолов", Бакинский Государственный Университет, г. Баку, Азербайджан.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0908-3693>

Information about co-authors:

Askarova G.M.

Doctorate Student, Researcher, "Chemistry of Alkenylphenols" Research Laboratory, Baku State University, Baku, Azerbaijan.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8571-2792>

Maharramov A.M.

Academician, Head of Organic Chemistry Chair, Baku State University, Baku, Azerbaijan.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1882-7519>

Bayramov M.R.

Professor, Doctor of Sciences in Chemistry, Head of Petrochemistry and Chemical Technology Chair, Baku State University, Baku, Azerbaijan.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1640-3392>

Agayeva M.A.

PhD in Chemistry, Leading Researcher, "Chemistry of Alkenylphenols" Research Laboratory, Baku State University, Baku, Azerbaijan.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0908-3693>

ИСТОРИЯ БИОМЕДИЦИНЫ

DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11814

К 90-летию со дня рождения Джун Алмейда

Джун Алмейда и ее вклад в развитие медицинской вирусологии

С.М.Рубинчик¹, А.Э.Дадашева², М.К.Мамедов³¹Госпиталь Святого Томаса, г.Лондон, Великобритания;²Республиканский центр по контролю за особо опасными инфекциями, г.Баку, Азербайджан;³Национальный центр онкологии, г.Баку, Азербайджан

Резюме: Очерк посвящен памяти выдающегося британского ученого в области Джун Алмейда, которая хорошо известна как создатель иммунной электронной микроскопии и первый исследователь который смог идентифицировать человеческий коронавирус. Авторы кратко охарактеризовали ее профессиональную биографию и главные научные достижения и оценили общий вклад внесенный в развитие медицинской вирусологии Д.Алмейда совместно с ее коллегами и последователями.

Ключевые слова: электронная микроскопия; иммуноэлектронная микроскопия; вирусология.

Для цитирования: Рубинчик С.М., Дадашева А.Э., Мамедов М.К. К 90-летию со дня рождения Джун Алмейда / Джун Алмейда и ее вклад в развитие медицинской вирусологии. Биомедицина (Баку). 2020;18(3):21-28. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11814

Поступила в редакцию: 03.07.2020. Принята в печать: 28.08.2020.

To the 90th anniversary of the birth of June Almeida

June Almeida and her contribution to medical virology development

Rubinchik S.¹, Dadasheva A.E.², Mamedov M.K.³¹St. Thomas' Hospital, London, United Kingdom;²Center for Control of Particularly Dangerous Infections, Baku, Azerbaijan;³National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan

Abstract: The essay is dedicated to memory eminent British scientist in virology June Almeida who well-known as a creator of immune electron microscopy and a first researcher who could identify the human coronavirus. The author briefly characterised her professional biography and main scientific achievements and estimated the whole contribution which was bringing to development of virology by J.Almeida together with her colleges and followers.

Key words: electron microscopy; immune electron microscopy; virology.

For citation: Rubinchik S., Dadasheva A.E., Mamedov M.K. To the 90th anniversary of the birth of June Almeida / June Almeida and her contribution to medical virology development. Biomedicine (Baku). 2020;18(3):21-28. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11814

Received: 03.07.2020. Accepted: 28.08.2020.

Для корреспонденции:

А.Э.Дадашева

Доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Центр по контролю за особо опасными инфекциями Министерства здравоохранения Азербайджанской Республики, г.Баку, Азербайджан. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9296-3426>. E-mail: aibeniz@inbox.ru

Corresponding author:

Dadasheva A.E.

Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Senior Researcher, Center for Control of Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Azerbaijan Republic, Baku, Azerbaijan. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9296-3426>. E-mail: aibeniz@inbox.ru

5 октября 2020 г исполнилось 90 лет с момента рождения Джун Д.Алмейда (June Dalziel Almeida), всемирно известного британского ученого, внесшего заметный вклад в развитие современной вирусологии [1]. Этот факт побудил нас вспомнить этого человека и воздать должное его заслугам перед медицинской наукой. Одновременно мы вспомнили и о вкладе в развитие науки, который был сделан работавшими вместе с ней коллегами и последователями.

Кратко пересказывая ее биографию, отметим, что Джун (Юнона), в девичестве носившая фамилию Харт, родилась в 1930 г в г. Глазго в семье водителя автобуса и работницы магазина. В 1947 г она окончила школу и несмотря на большие успехи в учебе из-за отсутствия средств для продолжения образования, она поступила на работу в недалеко расположенный от ее дома Королевский госпиталь Глазго на должность лаборанта гистопатологической лаборатории.

В 1952 г получив техническую квалификацию адъюнкта института медицинской лабораторной техники, она с родителями переехала в г. Лондон и стала заниматься оборудованием в больнице святого Варфоломея. Заметим, что она завершила свое университетское образование лишь значительно позже.

В Лондоне она встретила венесуэльского художника Энрикеса Алмейда и в 1954 г вышла за него замуж. В 1956 г они эмигрировали в Канаду и она стала техником по электронной микроскопии во вновь открытом в Торонто Институте рака Онтарิโอ (ИРО), ныне известном как раковый центр принцессы Маргарет. Здесь, она к 1958 г овладела основными навыками работы с электронным микроскопом и, в том числе, описанным в 1955 г британскими учеными Сиднеем Бреннером (S.Brenner) и Роберт Хорном (R.Horne) методом "негативного контрастирования" [2]. Использование этого метода в дальнейшем позволило ей решить ряд важных научно-практических задач.

Несмотря на отсутствие завершеного высшего образования она, благодаря настойчивости и совершенствованию навыков работы, вскоре завоевала репутацию блестящего специалиста и была повышена до должности исследователя.

В 1964 г ее лабораторию посетил профессор Энтони Уотерсон (A.P.Watson), недавно возглавивший департамент микробиологии в медицинской последипломной школе госпиталя Святого Томаса в г.Лондоне (Сент-Томас). Увидев профессионализм Алмейда, он пригласил ее присоединиться к его работе в Лондоне; приняв приглашение, она с 1964 г до 1967 г работала на базе госпиталя Сент-Томаса.



**Джун Д.Алмейда
(1930-2007)**

В 1967 г, после развода с мужем, она перешла на работу преподавателя в Королевскую Последипломную медицинскую школу Хаммерсмитского госпиталя при Лондонском университете, где ее шеф Э.Уотерсон возглавил департамент клинической вирусологии.

Здесь она продолжила профессиональную карьеру и одновременно завершила свое образование в 1970 г. В 1971 г по совокупности научных публикаций она получила ученую степень доктора наук (DSc).

В 1972 г она перешла на работу в исследовательскую лабораторию британской фармацевтической компании Wellcome в Бекенеме, где занималась совершенствованием диагностических методов и разработкой нескольких вакцин. В 1982 г она вышла замуж за вирусолога Филиппа Гарднера (1925-1994).

В то же время, именно в связи с ухудшением здоровья мужа в 1985 г она отошла от активной научной деятельности, хотя связь со своими коллегами не прерывала. Она вернулась в лабораторию госпиталя Сент-Томаса и до конца 80-х гг оставалась консультантом. В тот период ею вместе с коллегами были опубликованы несколько высококачественных фотографий вируса иммунодефицита человека.

Д.Алмейда умерла в возрасте 77 лет после сердечного приступа, случившегося 1 декабря 2007 г в

своем доме в Бексхиле, будучи окруженной любящими ее дочерью и двумя внучками.

Рассматривая значение изысканий Алмейда и ее коллег в развитии медицинской вирусологии, начнем с исследований, проведенных в период ее работы в Торонто и вероятно заложивших методологическую основу ее последующей научной деятельности.

Первым научным направлением, в развитии которого принимала участие Алмейда, была разработка методов электронно-микроскопической визуализации онкогенных вирусов, положившая основу экспериментальной онковирусологии. Эти исследования она вела, будучи ассистентом иммунолога Аллана Хауатсона (A.Howatson).

В течение 40 лет после сообщения П.Рауса о вирусной природе лейкоза цыплят, подтвердить существование связи вирусов с лейкозами у животных не удавалось. Лишь в 1951 г американец Людвиг Гросс (L.Gross) из Медицинского центра ветеранов в Бронксе сообщил о вирусе, вызывавшем лейкоз у мышей. В 1953 г он описал вирус крыс, который вызывал у мышей опухоли в слюнных железах и других тканях - его назвали вирусом полиомы.

В 1957 г группа А.Хауатсона начала сотрудничать с Л.Гроссом и сумела с помощью электронного микроскопа обнаружить в цитоплазме фиксированных на поверхности стекла опухолевых клеток мыши, вирусоподобные частицы. Позднее выяснилось, что визуализированный ими вирус оказался ретровирусом мышей [3, 4].

Вслед за этим А.Хауатсон, совместно с сотрудниками и при участии Алмейда, вырастили в культуре клеток почек мышей и визуализировали другой вирус - введя его группе беспородных мышей, через 3 мес они отметили появление у них опухолей в разных органах.

Вскоре эти ученые показали, что аналогичными морфологическими характеристиками обладает еще один вирус, связанный с несколькими типами опухолей у крыс, мышей и хомячков. Его культивировали ученые из Национального института здравоохранения США Сара Стьюарт (S.Stewart) и Бернис Эдди (B.Eddy), которые попытались воспроизвести результаты Л.Гросса. В итоге, группа А.Хауатсона установила, что последний вирус также являлся вирусом полиомы [5].

В процессе выполнения этих исследований Алмейда ярко проявила свои исследовательские способности. В итоге, она была повышена в должности и включена в число авторов ряда публикаций по онковирусологии, которые принесли известность ей и признание коллектива лаборатории

ИРО флагаманской научной группой, работающей в области онковирусологии.

Вторым направлением ее работы, проведенной в Канаде, было систематическое изучение молекулярной структуры вирусов. Активно используя метод негативного контрастирования препаратов, она еще в начале 60-х гг детально изучила архитектуру ряда вирусов - папилломы, гриппа, ветряной оспы, бешенства и др.

Благодаря упорству и тщательности проведения исследований ей удалось получить превосходные по качеству фотографии ряда вирусов. В полной мере воспользовавшись достоинствами метода негативного контрастирования, она сумела визуализировать крошечные детали вирусных частиц с достаточной четкостью и ряде случаев выявить ранее неизвестные детали молекулярной ультраструктуры соответствующих вирусов. Это позволило, исследуя архитектуру вирионов, выявлять важнейшие различия между разными вирионами. Последнее создало условия для классифицирования вирусов на молекулярном уровне. Полученные ею фотографии были напечатаны в ведущих мировых журналах и принесли ей известность среди вирусологов [6].

Алмейда считала, что структурные особенности вирусов могут представлять важный критерий, пригодный при составлении классификации вирусов. В статье, написанной ею в 1963 г, были представлены данные о структуре некоторых вирусов, уточняющие их положение в классификации [7]. Эти данные были приняты во внимание Международным Комитетом по таксономии вирусов и были включены в международную классификацию вирусов, изданную в 1966 г и опиравшуюся тогда в основном лишь на морфологические критерии.

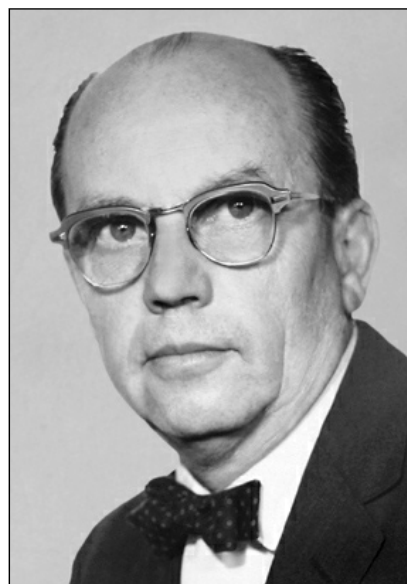
Еще одним направлением исследований, начатым в период работы в Канаде, но завершившимся уже в Англии стала разработка методически нового метода идентификации вирусов - иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ).

Строго говоря, этот метод нельзя было назвать новым, поскольку лежащий в его основе феномен ультрамикроскопической визуализации результата взаимодействия вирусных антигенов и антител к ним был описан еще в 1941 г двумя американскими учеными - Уинделом Стенли (W.Stanley), изучавшим вирус табачной мозаики (ВТМ) и вскоре получившим за это Нобелевскую премию и Томасом Андерсоном (T.Anderson), одним из наиболее известных в мире специалистов по электронной микроскопии вирусов.

Они смешали суспензию частиц ВТМ с сывороткой, содержащей антитела к ВТМ и после ин-



**У.М.Стенли
(1904-1971)**



**Т.Ф.Андерсон
(1911-1991)**

кубации смеси сделали ультрамикрофотографии полученного объекта. Оказалось, что антитела не только связывались с вирусными частицами и окружали их, но и объединяли их в более крупные агрегаты, легко обнаруживаемые в препарате [8].

В начале 60-х гг после встречи с Т.Андерсоном в Торонто Алмейда предположила, что применение использованного им принципа может расширить диапазон возможностей идентификации вирусов, проводимой с целью диагностики вирусных заболеваний.

С надеждой на это она совместно с А.Хауатсоном впервые воспроизвела принцип ИЭМ для визуализации вирусов папилломы и полиомы. Оказалось, что предварительная обработка соответствующими антителами частиц названных вирусов сделала их более заметными за счет появления вокруг них своеобразной оболочки из антител, порой и "антительных" мостиков между вирионами. Это позволяло выявлять вирусные частицы в плохо очищенных препаратах и даже визуализировать их внутри инфицированных клеток.

Прибытие Алмейды в медицинскую школу при госпитале Сент-Томаса совпало с началом переоборудования департамента микробиологии с акцентом на вирусологию и его соответствующего оснащения.

Здесь она возобновила свои исследования, посвященные ИЭМ и в течение нескольких лет, совместно с Уотерсоном, продолжала исследование диагностических возможностей этого метода и интенсивно занималась его совершенствованием и популяризацией [9].

Демонстрируя широкие диагностические возможности ИЭМ, ниже мы отметим лишь наиболее известные случаи ее успешного применения.

Первый из них связан с Альбертом Капикианом (А.Карикян) из Национального института аллергии и инфекционных болезней США, который в 1972 г использовал ИЭМ для расшифровки этиологии вспышки небактериального гастроэнтерита у детей в г.Норфолк штат Огайо - она оказалась обусловленной вирусом, названным "вирусом Норфолк" [10]. За 2 года до этого он работал в лаборатории Алмейды и с ее помощью освоил метод ИЭМ. Сегодня известно, открытый им вирус был первый вирусом из рода *Norovirus* семейства калицивирусов.

В 1973 г ИЭМ был применен для визуализации и идентификации вируса гепатита А (ВГА) - это было осуществлено группой ученых, во главе со Стефеном Файнстоуном (S.Feinstone) из Национального института аллергии и инфекционных болезней США [11].

В 1981 г А.Г.Анджапаридзе, работавший в лаборатории гепатитов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов в г.Москве, с помощью ИЭМ впервые визуализировал вирус гепатита А2, который позднее был признан вирусом гепатита Е. Один из авторов этих строк в то время был в числе сотрудников этой лаборатории, которые первыми увидели иммуноэлектронные фотографии того вируса [12]. Отметим, что в этой лаборатории ИЭМ и прежде применялся при выделении чистого антигена ВГА, использованного для разработки одной из модификаций иммуноферментного метода диагностики инфекции, вызванной ВГА [13].



С.М.Файнстоун



А.Г.Анджапаридзе

Надо отметить, что позднее А.Г.Анджапаридзе и его группа широко и успешно использовала ИЭМ в экспериментальных наблюдениях, в ходе которых была детально исследована инфекция, вызванная вирусом гепатита А у разных видов обезьян [14].

Оценивая вклад Алмейда в развитие метода ИЭМ, надо подчеркнуть, что хотя положенный в его основу принцип был известен и до нее, широкое научно-практическое применение этот метод нашел лишь после публикации ее работ. Действительно, именно Алмейда показала, что в умелых руках ИЭМ может стать бесценным инструментом для визуализации и идентификации вирусов и одним из самых быстрых и эффективных методов быстрой диагностики вирусных инфекций [15]. Это позволяет считать, что основоположником этого метода является именно Д.Алмейда.

Среди исследований Алмейда, проведенных в госпитале Сент-Томаса важное значение имели наблюдения в области изучения группы пневмотропных вирусов, включая те из них, которые ныне известны под названием "коронавирусы".

Все началось со знакомства Алмейда с английским вирусологом Дэвидом Тирреллом (D.Tyrrrell), руководившим находившейся в Солсбери лабораторией, занятой изучением этиологии простудных заболеваний детей.

Узнав от Уотерсона о высокой квалификации Алмейда, он предложил ей принять участие в его исследованиях, в ходе которых его научная группа пыталась идентифицировать ранее неизвестный РНК-содержащий вирус, который был выделен на

культуре клеток в 1965 г из дыхательных путей детей, живущих в интернате. Получив согласие, он передал Алмейда коллекцию образцов органной ткани, содержащей ранее неизвестный вирус.

Исследуя этот материал, Алмейда выявила вирусные частицы, по структуре имеющие некоторое сходство с вирусом гриппа. Но в отличие от последнего, эти частицы по периферии были окружены радиально, в форме лучей, расположенными отростками, которые выглядели в форме ореола или короны. Именно последнее обстоятельство побудило Алмейда и Тиррелл назвать вирус "коронавирусом".

Кроме того, эти частицы имели сходство с другими вирусными частицами, которые Алмейда видел в материалах от цыплят с инфекционным бронхитом и мышей с гепатитом. Это навело ее на мысль о том, что эти вирусы могут относиться к одной и той же группе, которая была сформулирована в изданной в 1967 г статье ученых [16]. Однако, обоснованность этой точки зрения была признана лишь спустя год в статье, где также был использован термин "коронавирусы".

В 1971 г в международной классификации вирусов был выделен род "коронавирусов". В 1978 г группа ученых во главе с Д.Алмейда, предложила создать семейство Coronaviridae и включить в него около десятка известных в то время сходных вирусов животных и человека. Такое семейство было выделено в классификации вирусов в 1982 г. Сегодня эта классификация пополнилась тремя коронавирусами, вызывающими инфекции у людей - SARS, MERS и COVID-19 [17].

Наконец, в стенах лаборатории госпиталя

Сент-Томаса Алмейда проведя еще одно исследование, посвященное изучению ультраструктуры вируса краснухи, который был получен в клеточной культуре в 1962 г, но не был визуализирован. Первые четкие снимки этого вируса были получены Алмейда и ее коллегами в 1967 г [18].

Перейдя на работу в лабораторию Хаммерсмитского госпиталя, Алмейда занялась проблемой вирусного гепатита В (ГВ), поскольку в конце 60-х гг эта проблема приобрела значительную актуальность.

К 1968 г было известно, что при ГВ в крови с помощью реакции иммунодиффузии или иммуноэлектрофореза регулярно обнаруживается особый белок, названный "австралийским антигеном". Однако, какие-либо морфологические структуры, связанные с этим антигеном, оставались неидентифицированными. Этот факт побудил Алмейда заняться исследованием этого антигена с помощью электронного микроскопа.

Уже в конце 1969 г к ней за консультативной помощью обратился вирусолог Дэвид Дейн (D.Dane) из лондонской больницы Мидлсекс. При электронно-микроскопическом исследовании крови больного гемофилией, содержащей австралийский антиген, он обнаружил сферические структуры со средним диаметром 42 нанометра, которые он расценил как частицы ВГВ - после публикации его статьи в 1970 г они получили название "частиц Дейна" [19]. Однако, наряду с этими частицами, в препарате он выявил большое количество мелких гранул, что поставило перед ним вопрос о связи этих структур с ВГВ.

Работая с этим материалом, Алмейда обработала его детергентом, расщепляющим жировые структуры, покрывающие частицы. Далее она обнаружила, что частицы Дейна представляет собой сформированный более мелкими структурами многогранный капсид ВГВ, проникающий в клетки печени человека. Эти мелкие структуры вскоре получили общеизвестное обозначение - HBsAg.

Более того, получив четкие снимки вирусных частиц, Алмейда пришла к выводу, что внутри этих частиц имеется ядро - оказалось, что основу этого



**Д.А.Тиррелл
(1925-2005)**

ядра составляет белок, также имеющий антигенные свойства и названный "сердцевинным антигеном" - HBcAg. В силу этого факта принято считать, что существование HBcAg, не связанного с HBsAg, было впервые установлено Алмейда [20].

Оценивая вклад Алмейда в вирусологию, следует подчеркнуть, что ее исследования не только обогатили науку, но и помогли открыть новую эру в развитии вирусологии, переместив ее из области теоретического интереса в сферу клинической диагностики.

Биография Джун Алмейда ярко показала, как способная школьница, не имевшая возможности продолжить образование, смогла стать всемирно известным ученым, чьи навыки и знания позволили ей не только идентифицировать ранее неизвестные вирусы и внести свой вклад в развитие классификации вирусов, но и установить особенности патогенеза вирусных инфекций и усовершенствовать методы диагностики вирусных инфекций. Неудивительно, что в сентябре 2020 года в Лондоне была создана мемориальная лаборатория имени Джун Алмейда, занимающаяся диагностикой COVID-19.

Литература

1. Gellene D. Overlooked no more: June Almeida, scientist who identified the first coronavirus. The New York Times. 2020, 8 May. Режим доступа: <https://www.nytimes.com/2020/05/08/obituaries/june-almeida-overlooked-coronavirus.html>
2. Brenner S., Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim Biophys Acta. 1959 Jul;34:103-10. DOI: 10.1016/0006-3002(59)90237-9.
3. Howatson A.F. Almeida J.D. A method for the study of cultured cells by thin sectioning and electron microscopy. J Biophys Biochem Cytol. 1958;Jan 25;4(1):115-8. DOI: 10.1083/jcb.4.1.115.

4. Howatson A.F., Almeida J.D. An electron microscope study of polyoma virus in hamster kidney. *J Biophys Biochem Cytol.* 1960 Jul;7(4):753-60. DOI: 10.1083/jcb.7.4.753.
5. Howatson A., McCulloch E., Almeida J. et al. Studies in vitro, in vivo, and by electron microscope of a virus recovered from a C3H mouse mammary tumor: relationship to polyoma virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 1960;24(5):1131-1151. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/24.5.1131>
6. Almeida J.D., Howatson A.F. A negative staining method for cell-associated virus. *J Cell Biol.* 1963;16(3):616-620. DOI:10.1083/jcb.16.3.616
7. Almeida J. A classification of virus particles based on morphology. *Can Med Assoc J.* 1963;89(16):787-798. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1922067/>
8. Anderson T.F., Stanley W.M. A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum. *J. Biology Chemistry.* 1941;139(1):339-344. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)51390-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)51390-4)
9. Almeida J.D., Waterson A.P. The morphology of virus-antibody interaction. *Advances in Virus Research.* 1969;15:307-338. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60878-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60878-7)
10. Kapikian A. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Infect. Dis.* 2000;181:295-302. DOI: <https://doi.org/10.1086/315584>
11. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science.* 1973;182(4116):1026-8. DOI: 10.1126/science.182.4116.1026.
12. Мамедов М.К. Вирус гепатита Е и вызванная им инфекция: итоги тридцатилетнего изучения. *Биомедицина (Баку).* 2011;2:39-47. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/virus-gepatita-e-i-vyzvanaya-im-infektsiya-osnovnye-itogi-tridtsatiletnego-izucheniya>
13. Мамедов М.К., Анджапаридзе А.Г., Балаян М.С. Разработка упрощенной модификации энзимо-иммуносорбентного метода обнаружения вируса гепатита А и антигена к нему. *Вирусные гепатиты.* Под ред. В.М.Жданова и Е.С.Кетиладзе. М. 1983:17-22.
14. Анджапаридзе А.Г., Полещук В.Ф., Замятина Н.А. и др. Спонтанный гепатит у яванской макаки, подвергнутой воздействию иммунодепрессантов. *Вопросы вирусологии.* 1985;30(4):468-74. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2998096/>
15. Almeida J. Cinader B. Howatson A. The structure of antigen-antibody complexes: A study by electron microscopy. *J Exp Med.* 1963;118(3):327-340. DOI:10.1084/jem.118.3.327
16. Almeida JD, Tyrrell DA. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol.* 1967 Apr;1(2):175-8. DOI: 10.1099/0022-1317-1-2-175.
17. Мамедов М.К., Дадашева А.Э., Исмаилова Р.И., Кадырова А.А. Коронавирусные инфекции: вчера и сегодня. *Современные достижения азербайджанской медицины.* 2020;1:3-10. Режим доступа: http://maamjournal.az/download/dost_n1_2020.pdf
18. Best J. Banatvala J., Almeida J. Waterson, A. Morphological characteristics of rubella virus. *Lancet.* 1967;290(7509):237- 239. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(67\)92302-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(67)92302-1)
19. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1970;1(7649):695-8. DOI: 10.1016/s0140-6736(70)90926-8.
20. Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet.* 1971;2(7736):1225-7. DOI: 10.1016/s0140-6736(71)90543-5.

References

1. Gellene D. Overlooked no more: June Almeida, scientist who identified the first coronavirus. *The New York Times.* 2020, 8 May. Available at: <https://www.nytimes.com/2020/05/08/obituaries/june-almeida-overlooked-coronavirus.html>
2. Brenner S., Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta.* 1959 Jul;34:103-10. DOI: 10.1016/0006-3002(59)90237-9.
3. Howatson A.F. Almeida J.D. A method for the study of cultured cells by thin sectioning and electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958;Jan 25;4(1):115-8. DOI: 10.1083/jcb.4.1.115.
4. Howatson A.F., Almeida J.D. An electron microscope study of polyoma virus in hamster kidney. *J Biophys Biochem Cytol.* 1960 Jul;7(4):753-60. DOI: 10.1083/jcb.7.4.753.
5. Howatson A., McCulloch E., Almeida J. et al. Studies in vitro, in vivo, and by electron microscope of a

virus recovered from a C3H mouse mammary tumor: relationship to polyoma virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 1960; 24(5):1131-1151. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/24.5.1131>

6. Almeida J.D., Howatson A.F. A negative staining method for cell-associated virus. *J Cell Biol.* 1963;16(3): 616-620. DOI:10.1083/jcb.16.3.616

7. Almeida J. A classification of virus particles based on morphology. *Can Med Assoc J.* 1963;89(16):787-798. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1922067/>

8. Anderson T.F., Stanley W.M. A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum. *J. Biology Chemistry.* 1941;139(1):339-344. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)51390-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)51390-4)

9. Almeida J.D., Waterson A.P. The morphology of virus-antibody interaction. *Advances in Virus Research.* 1969;15:307-338. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60878-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60878-7)

10. Kapikian A. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Infect. Dis.* 2000;181:295-302. DOI: <https://doi.org/10.1086/315584>

11. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science.* 1973;182(4116):1026-8. DOI: 10.1126/science.182.4116.1026.

12. Мамедов М.К. Hepatitis A virus and its infection: the basic results of thirty-year researches. *Biomedicine (Baku).* 2011;2:39-47. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/virus-gepatita-e-i-vyzvannaya-im-infektsiya-osnovnye-itogi-tridsatiletnego-izucheniya> (In Russian).

13. Mamedov M.K., Andzhaparidze A.G., Balayan M.S. Razrabotka uproshtchennoi modifikatsii enzimoimmunosorbentnogo metoda obnaruzheniya virusa gepatita A i antigena k nemu. *Virusnye gepatity.* Eds. Zhdanov V.M. and Ketiladze E.S. M. 1983:17-22. (In Russian).

14. Andzhaparidze AG, Poleshchuk VF, Zamiatina NA, et al. Spontanniy gepatit u iavanskoy makaki, podvergnutoy vozdeystviyu immunodepressantov [Spontaneous hepatitis in the crab-eating macaque exposed to immunodepressants]. *Vopr Virusol.* 1985;30(4):468-74. (In Russian). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2998096/>

15. Almeida J. Cinader B. Howatson A. The structure of antigen-antibody complexes: A study by electron microscopy. *J Exp Med.* 1963;118(3):327-340. DOI:10.1084/jem.118.3.327

16. Almeida JD, Tyrrell DA. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol.* 1967 Apr;1(2):175-8. DOI: 10.1099/0022-1317-1-2-175.

17. Mamedov M., Dadasheva A., Ismayilova R., Kadyrova A. Coronaviral infections: yesterday and today. *Modern Achievements of Azerbaijan Medicine.* 2020;1:3-10. Available at: http://maamjournal.az/download/dost_n1_2020.pdf (In Russian).

18. Best J. Banatvala J., Almeida J. Waterson, A. Morphological characteristics of rubella virus. *Lancet.* 1967;290(7509):237- 239. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(67\)92302-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(67)92302-1)

19. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1970;1(7649):695-8. DOI: 10.1016/s0140-6736(70)90926-8.

20. Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet.* 1971;2(7736):1225-7. DOI: 10.1016/s0140-6736(71)90543-5.

Информация о соавторах:

С.М.Рубинчик

Доктор философии по биомедицине, вирусолог, лаборатория Виापас, Госпиталь Святого Томаса, г.Лондон, Великобритания.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2679-4828>

М.К.Мамедов

Профессор, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Национальный центр онкологии, г.Баку, Азербайджан. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9777-1914>

Information about co-authors:

Rubinchik S.

PhD in Biomedicine, Virologist, Viapath Laboratory, St. Thomas' Hospital, London, United Kingdom.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2679-4828>

Mamedov M.K.

Professor, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9777-1914>

DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11815

**К 65-ти летию открытия диагностической значимости
активности сывороточных аминотрансфераз
при патологии печени**

**Успехи лабораторной и инструментальной диагностики как
прямые стимулы развития клинической гепатологии**

М.К.Мамедов¹, А.Э.Дадашева²

¹Национальный центр онкологии, г.Баку, Азербайджан;

²Республиканский центр по контролю за особо опасными инфекциями, г.Баку, Азербайджан

Резюме: Авторы очерка кратко охарактеризовали основные подходы к эффективному применению разных лабораторных и инструментальных методов в выявлении заболеваний печени и показали роль этих методов в качестве прямых стимулов к развитию клинической гепатологии с начала XIX века до наших дней.

Ключевые слова: аминотрансферазы, патология печени, клиническая гепатология.

Для цитирования: Мамедов М.К., Дадашева А.Э. К 65-ти летию открытия диагностической значимости активности сывороточных аминотрансфераз при патологии печени / Успехи лабораторной и инструментальной диагностики как прямые стимулы развития клинической гепатологии. Биомедицина (Баку). 2020;18(3):29-36. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11815

Поступила в редакцию: 10.07.2020. Принята в печать: 28.08.2020.

**To the 65th anniversary of the discovery of diagnostic significance
of serum aminotransferases activity in liver pathology**

**Successes of laboratory and tool-making diagnostic as a stimulus
of clinical hepatology development**

Mamedov M.K.¹, Dadasheva A.E.²

¹National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan;

²Center for Control of Particularly Dangerous Infections, Baku, Azerbaijan

Abstract: In the essay the authors briefly characterised basic approaches to effective application different laboratorial and tool-making methods in detection of liver diseases and demonstrated role of these methods as a direct promoter in development of clinical hepatology from the beginning of XIX century up to now.

Key words: aminotransferases, liver pathology, clinical hepatology.

For citation: Mamedov M.K., Dadasheva A.E. To the 65th anniversary of the discovery of diagnostic significance of serum aminotransferases activity in liver pathology / Successes of laboratory and tool-making diagnostic as a stimulus of clinical hepatology development. Biomedicine (Baku). 2020;18(3):29-36. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11815

Received: 03.07.2020. Accepted: 28.08.2020.

Для корреспонденции:

А.Э.Дадашева

Доктор медицинских наук, старший научный сотрудник,
Центр по контролю за особо опасными инфекциями Министер-
ства здравоохранения Азербайджанской Республики, г.Баку,
Азербайджан. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9296-3426>
E-mail: aibeniz@inbox.ru

Corresponding author:

Dadasheva A.E.

Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, Senior Research-
er, Center for Control of Particularly Dangerous Infections of
the Ministry of Health of the Azerbaijan Republic, Baku,
Azerbaijan. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9296-3426>
E-mail: aibeniz@inbox.ru

Клиническая гепатология, как часть гастроэнтерологии, стала обретать контуры самостоятельной отрасли медицины лишь во второй половине XX в [1]. Одним из событий, стимулировавших ее формирование стало появление возможности выявления, в первую очередь, субклинически протекающих болезней как самой печени, так и структурно и физиологически связанных с ней функциональных систем. Ясно, что до появления такой возможности, бессимптомно протекающие болезни оставались нераспознанными.

Соответственно, появление такой возможности могло расширить спектр идентифицированных заболеваний этого органа.

Появление такой возможности было связано с разработкой 65 лет назад метода определения в сыворотке крови активности аминотрансфераз, позволившего на ранних стадиях диагностировать диффузно-воспалительные заболевания печени и значительно расширившего возможности диагностики болезней печени, протекавших с деструкцией гепатоцитов.

Однако, эта исключительно плодотворная методологическая инновация, сыгравшая важную роль в дальнейшем развитии клинической гепатологии, оказалась лишь очередным шагом на почти двухсотлетнем пути внедрения биохимических и иных методов в лабораторную диагностику болезней печени. Именно это обстоятельство побудило нас составить небольшой очерк о тех лабораторных и инструментальных методах, применение которых, так или иначе, стимулировало развитие клинической гепатологии, как самостоятельной дисциплины.

Сегодня большинство ученых полагает, что началом упомянутого пути следует считать внедрение в практику методов определения в крови (и в моче) концентрации билирубина, поскольку именно желтуха, как симптом, на протяжении столетий считалась наиболее известным признаком, характерным для большинства заболеваний печени.

Известно, что наибольший вклад в изучение природы и причин развития желтухи внес Гален, который различал несколько типов этого симптома. Однако, воззрения Галена на протяжении нескольких столетий оставались гипотетическими, а истинные причины и механизмы изменений при болезнях печени, протекающих с нормальной окраской не только кожи и видимых слизистых оболочек, но и мочи и стула, оставались неясными и, потому, не могли корректно трактоваться врачами [2].

Лишь в 1789 г французский химик Антуан Фуркруа (A.Fourcroy) впервые высказал мысль о

том, что цвет желчи обусловлен особым "зеленым" пигментом. Но в 1824 г немецкий химик Леопольд Гмелин (L.Gmelin), исследуя состав желчи, идентифицировал в ней не один, а два пигмента: "зеленый" и "коричневый". Для их выявления в 1826 г он предложил использовать азотную кислоту - и хотя этот метод уже не применяется, сегодня он известен как "реакция Гмелина".

В 1844 г выдающийся шведский химик Й.Берцелиус (J.Berzelius) зеленый пигмент желчи назвал "биливердином". Коричневый пигмент "билирубином" назвал в 1864 г немец Г.Штаделер (G.Stadeler) [3].

В 1847 г Рудольф Вирхов, наблюдая и исследуя эволюцию подкожных гематом и изменение их окраски, описал пигмент и назвал его "гематоидин", полагая, что он имеет кровяное происхождение. Исходя из концепции Галена о "превращении крови в желчь", поддержанной сторонником дискразической концепции желтухи австрийским морфологом К.Рокитанским (1846), Вирхов пришел к выводу о том, что последовательное изменение окраски гематом обусловлено превращением пигментов крови в пигменты желчи [2]. В 1858 г немецкий врач Виллем Кюне (W.Kuhne) предложил метод определения уровня билирубина в крови, который, однако, был трудоемким и не нашел практического применения. Несколько других методов, предложенных для определения уровня билирубина в сыворотке крови также оказались непригодными для клинической практики.

Неудивительно, что в книге Ф.Фрерихса (F.Frerichs) "Клиника болезней печени", изданной в 1861 г, отсутствуют сведения о клиническом значении уровня билирубина в крови, а разные типы желтух характеризовались недостаточно четкими терминами, использованными еще Галеном: *subicterus*, *flavinicterus*, *verdinicterus*, *rubinicterus* и *melasicterus*. Заметим, что эти же термины использовались в литературе для описания разных желтух и в начале XX в.

В 1878 г Пауль Эрлих (P.Erlich) установил, что при добавлении билирубина к водному раствору диазофенилсульфоновой кислоты (позже названному "диазореактивом Эрлиха") появляется карминовокрасное окрашивание раствора. На основе этого феномена в 1916 г датский врач Химанс ван ден Берг (H.Van den Bergh) разработал достаточно простой метод определения в крови как общей концентрации билирубина, так и уровней его "прямой" (связанной с глюкуроновыми кислотами) и "непрямой" (свободной) фракций [4].

Этот метод сыграл исключительную роль в развитии диагностики заболеваний печени, пос-

кольку он позволял не только выявлять пациентов с умеренно повышенным уровнем билирубина, но и отличать паренхиматозную и механическую желтухи от гемолитической, для которой более характерна непрямая реакция. Интересно, что химизм взаимодействия билирубина с диазореактивом был выяснен лишь в середине 50-х гг XX в. Во многом это было связано с тем, что данные о точной химической структуре билирубина и механизмах его образования из гемоглобина оставались неясными. Эти данные были получены немецким химиком Хансом Фишером (H.Fischer), который с 1910 г много лет занимался изучением структуры билирубина и других пигментов крови - в итоге лишь в конце 20-х гг XX в он синтезировал билирубин и гемин и установил их химические формулы (в 1930 г за эти исследования был удостоен Нобелевской премии по химии).

Вместе с тем, внедрение в практику методов определения билирубина, не решило все диагностические задачи и попытки применения в диагностике других подходов продолжались. Так, с этой целью было предложено использовать тесты, позже объединенные под названием "коллоидных проб". Так, в 1925 г японцы М.Takata и К.Ara описали пробу с сулемой (сулемовая проба Таката-Ара). В 1930 г австриец О.Weltman разработал пробу с хлоридом кальция (проба Вельтмана). В 1944 г англичанин N.Maclagan предложил тимоловую пробу (проба Маклагана), а в 1945 г американцы С.Wunderly и F.Wuhrmann описали пробу с кадмией (проба Вундерли-Вурмана.) Однако, все эти и другие коллоидные пробы отражали лишь нарушения коллоидной устойчивости белков сыворотки и выявляли диспротеинемии в форме изменения соотношения крупно- и мелкодисперсных белков крови. Эти показатели имели реальное значение, в основном, лишь при обследовании пациентов с хроническими заболеваниями печени [5]. Соответственно, уже к концу XX в эти пробы утратили свое диагностическое значение и перестали использоваться в клинической практике.

Между тем, революционное значение для диагностики заболеваний печени имели достижения в области клинической энзимологии, отмеченные во второй половине 50-х гг XX в. Так, 1954 г Джон Леду (J.LaDue) и Феликс Вроблевский (F.Wroblewski), изучавшие биохимию болезней сердца в Институте



Феликс Вроблевский (слева) и Джон Леду (справа) в лаборатории (1956 г)

Слоан-Кеттеринг в Нью-Йорке установили, что трансмуральный инфаркт миокарда всегда сопровождается повышением в сыворотке крови активности аминотрансфераз - поэтому такое повышение они предложили считать биохимическим маркером этого заболевания [6].

Однако уже через год эти же исследователи выяснили, что повышение активности аминотрансфераз в крови регулярно отмечается и при повреждении гепатоцитов [6]. Детально изучив этот феномен, они в 1956-1957 гг сообщили о том, что повышение активности этих ферментов в крови может указывать на цитолиз гепатоцитов и быть биохимическим маркером гепатита, с помощью которого возможно даже определить патогенетический тип желтухи [7, 8].

Вскоре итальянские врачи Фернандо де Ритис (F.deRitis), Марио Колтори (M.Coltorti) и Джузеппе Джусти (G.Giusti) установили, что для инфаркта миокарда больше характерно повышение преимущественно аспартат-аминотрансферазы (АсАТ), в то время как при повреждении клеток печени повышается активность, главным образом, аланин-аминотрансферазы (АлАТ). Для дифференциации "сердечного" и "печеночного" генеза гиперминотрансфераземии они предложили использовать соотношение активности АсАТ и АлАТ, позднее названное "коэффициентом де Ритиса". Выяснилось, что превышение активности АсАТ над активностью АлАТ может указывать на развитие в печени фиброзно-цирротического процесса [9].

Эти данные стимулировали поиски возможностей применения в аналогичной роли и других ферментов. Однако уже к середине 60-х гг XX в было установлено, что при заболеваниях печени,

определение в крови активности целого ряда других ферментов не дает каких-либо реальных преимуществ по сравнению с АЛТ и АсАТ. Исключением в этом смысле стали лишь гамма-глутамилтранспептидаза и щелочная фосфатаза, активность которых повышалась при развитии внутрипеченочного холестаза и/или при вовлечении в процесс стромальных элементов печени.

Итак, повышение активности аминотрансфераз в крови и сегодня считается самым чувствительным признаком повреждения гепатоцитов и первым "сигналом тревоги" в отношении патологии печени. Благодаря этому методу удалось выявить широкий спектр субклинически протекающих болезней печени и, главное, доказать реальное существование хронического гепатита, как широко распространенного заболевания - это позволило выявить "недостающее" звено между острым гепатитом и циррозом печени. Поэтому считается, что именно применение этого метода, вместе с расширением масштабов применения пункционной биопсии печени, открыло новую эру развития современной гепатологии [10].

Следует отметить, что в расширение и углубление представлений о патогенезе заболеваний печени прогрессивную роль сыграло и развитие коагулологических методов. Так, в 1935 г американский врач Арманд Квик (A.J.Quick) предложил метод определения "протромбинового индекса" (индекса Квика), достаточно объективно отражающего состояние синтетической функции печени. Между прочим, именно А.Квик еще в 1933 г предложил для оценки обезвреживающей функции печени использовать пробу с введением бензоата натрия и определения в моче гиппуровой кислоты; в 1941 г эта проба была модифицирована А.Я.Пытелем и ныне известна, как проба Квика-Пытеля [11].

Надо упомянуть и о роли иммунологических методов, стимулировавших прогресс клинической гепатологии в начале второй половины XX в. С их помощью удалось идентифицировать заболевания, сегодня объединяемые под названием "аутоиммунные заболевания печени". Надо иметь в виду, что прямой предпосылкой этому стали полученные к концу 40-х гг XX в доказательства того, что антитела относятся к гамма-глобулиновой фракции белков сыворотки крови.

В 1950 г шведский врач Ян Вальденстрем (J.Waldenstrom) впервые у нескольких молодых женщин детально описал длительно текущий неинфекционный гепатит, сопровождавшийся косвенными клиническими признаками гормонального дисбаланса и поддававшихся лечению адрено-

кортикотропным гормоном. Выявлялось и повышение в крови гаммаглобулинов, что наводило на мысль о возможной иммунологической подоплеке болезни. В 1956 г австралиец Иен Мак-Кей (I.R.Maskay), приняв во внимание уже имевшиеся данные о регулярном появлении в крови таких больных "волчаночных" LE-клеток, назвал это заболевание "люпоидным гепатитом".

В этот период в Англии иммунологи Дебора Дониак (D.Doniach), Джон Уокер (J.Walker), Айвен Ройт (I.Roitt) интенсивно исследовали роль собственных антител в патогенезе идиопатического тиреоидита и зоба Хашимото. В 1956 г к этой группе присоединилась Шейла Шерлок (S.Sherlock), занявшаяся изучением природы "люпоидного гепатита". Вскоре они обнаружили, что при таком гепатите всегда выявляются собственные антитела (аутоантитела) к ядрам клеток - антиядерные антитела (ANA); стало очевидным, что наличие в крови ANA может стать иммунологическим маркером такого гепатита.

К этому времени в США Эрнст Витебский (E.Witebsky) и Ноэль Роуз (N.Rose) заложили основу концепции об аутоиммунных заболеваниях и разработали систему критериев для их определения. Поскольку последние соответствовали люпоидному гепатиту, в 1965 г И.МакКей и другие ученые назвали его "аутоиммунным гепатитом" [12].

Вместе с тем, уже к середине 60-х гг XX в усилиями Ш.Шерлок и других иммунологов было показано, что диагностическое значение могут иметь и иные аутоантитела: анти-митохондриальные (AMA), анти-гладкомышечные (ASMA), анти-микросомальные (A-LKM) и др. Стало формироваться представление о существовании двух типов аутоиммунного гепатита, маркируемых разными аутоантителами. Кроме того, выяснилось, что аутоиммунную природу имеет и "первичный билиарный цирроз" печени. В итоге, в наши дни такие заболевания часто объединяют в группу "аутоиммунных заболеваний печени" [13].

Примером успешного применения иммунологических методов в практике клинической гепатологии может стать и определение альфафетопротеина (АФП), белка, впервые описанного еще в 1944 г и получившего это название в 1956 г. В 1962-1963 г изучая антипенный состав крови у мышей с гепатомой Г.И.Абелев обнаружил регулярное повышение в крови АФП. Уже в 1964 г Ю.С.Татаринев, используя подход Абелева, обнаружил АФП в крови человека с гепатоцеллюлярным раком и предложил рассматривать АФП в качестве иммунологического маркера этой опухоли. И хотя сегодня определение АФП не является основным методом диагнос-

тики, в свое время применение этого метода заметно расширило возможности гепатологии [14].

Непреодолимое значение для развития гепатологии имело и совершенствование морфологических методов исследования печени и, в первую очередь, прижизненного гистологического исследования ее ткани и использования с этой целью гистохимических, иммунологических, а в последние годы, молекулярно-генетических методов. Поскольку для получения образцов ткани печени необходимо проведение биопсии печени, кратко остановимся на значении этого метода.

Хотя сообщения о проведении пункционной биопсии печени эпизодически появлялись в научных журналах еще в начале XX в, практика "прицельной" биопсии печени стала внедряться после сообщения Хейнца Калька (H.Kalk), который в Германии в 1929 г сконструировал лапароскоп и с его помощью осуществил биопсию печени [3].

Отдельного упоминания заслуживает проведенное в 1939 г наблюдение датчан Кая Роольма (K.Roholm) и Пауля Иверсена (P.Iversen), использовавших чрезкожный "слепой" метод прижизненной пункционной биопсии печени для обследования 38 больных острым эпидемическим гепатитом. Ныне считается, что в этом наблюдении было окончательно доказано существование прямой связи между эпидемической желтухой и воспалительными изменениями в ткани печени [15].

Надо сказать, что в то время прижизненная пункционная биопсия печени оставалась опасной процедурой. Лишь спустя 20 лет после появления пункционной иглы Джорджио Менгини (G.Mengini), удалось минимизировать частоту осложнений этой манипуляции, что, как уже отмечалось, ознаменовало новый этап развития гепатологии [16, 17].

Расширению масштабов применения биопсии печени способствовало появление аппаратуры для проведения ультразвукового исследования (УЗИ) печени. Отметим и то, что ее использование расширило возможности оценки не только состояния печени и ее сосудов при диффузной патологии, но и позволило в ранние сроки визуализировать очаговые (опухолевые и иные) заболевания этого органа [18].

Однако, первый ультразвуковой сканер Vidason германской компании Siemens, появившийся в 1965 г, предназначался для применения в акушерстве. Аналогичные приборы для применения в гастроэнтерологии появились позже - их начали выпускать в Японии (с 1973 г фирма Hitachi, а с 1975 г фирма Aloka). После этого биопсию печени стали проводить под "контролем" УЗИ - это значительно расширило показания к исследованию и его

диагностические возможности и повысило его безопасность [11].

На основе обобщения результатов множества морфологических исследований биоптатов печени была разработана система критериев, позволившая объективно оценивать степень изменений ее тканей. Уже в 1981 г в США морфологи Роберт Ноделл (R.Knodell), Камал Исхак (K.Isshak) и их коллеги предложили для оценки активности фиброза в печени использовать "индекс гистологической активности фиброза" (индекс Ноделя). Было выделено 5 стадий фиброза, отражающих изменения ткани печени на пути к ее циррозу - от F0 до F4 [19].

Позже критерии этой системы оценки уточнили и свели к современной шкале Metavir, что позволило биопсии печени обрести статус "золотого стандарта" диагностики диффузных заболеваний печени [20]. И именно на основе данных, полученных с помощью клинических и морфологических исследований, была создана современная классификация хронических гепатитов и гепатозов [21].

Вместе с тем, инвазивность этого метода и существование ряда противопоказаний к его применению оказалось стимулом для поиска альтернативных подходов. В итоге в самом конце 90-х гг XX в была разработана группа лабораторных методов, позволяющих косвенно оценивать морфофункциональное состояние печени - эти методы известны специалистам под названием "фибротесты". Они основывались на корреляции степени фиброза печени с показателем, который с помощью определенных формул вычислялся на основе результатов определения нескольких биохимических показателей сыворотки крови, при этом результаты выражали в стадиях фиброза - от F0 до F4 [17].

Но несмотря на доступность и простоту применения, эти методы не смогли стать полноценной альтернативой биопсии печени. Таковой стал лишь разработанный чуть более 10 лет назад неинвазивный метод "фиброэластометрии печени" (или короче "эластометрии"), ныне признаваемой наиболее важной инновацией в диагностике заболеваний печени [22].

Эластометрия основана на прямой корреляции механической эластичности ткани печени и степени распространенности в ней фиброза. В 2008 г началось производство ультразвукового прибора - FibroScan, позволяющего проводить эластометрию печени и других паренхиматозных органов. Позже была разработана более совершенная и более информативная технология "транспарентной эластометрии".

Хотя эластометрия не может полностью заменить биопсию печени, по диагностическим воз-

можностям она мало в чем уступает ей, позволяя анализировать структуры печени и оценивать ее основные показатели, а при динамическом применении - мониторировать течение хронических заболеваний печени и даже оценивать эффективность проводимой терапии.

Итак, можно полагать, что достижения в области лабораторной и инструментальной диагностики на протяжении более ста лет действительно во многих случаях становились прямыми стимулами развития корректных представлений о печени и природе ее заболеваний.

Более того, скорее всего, именно успехи в этих областях прямо способствовали тому, что в конце 60-х гг XX в начался процесс "выделения из" гастроэнтерологии самостоятельной дисциплины, рассматривающей патологию только печени и названной "гепатологией", т.е. термином, являющимся удобным синонимом словосочетания "учение о болезнях печени". Именно в тот период начал издаваться англоязычный журнал *Hepatology* и вышли в свет руководства и монографии, названия которых включали слово "гепатология".

К этому надо добавить и то, что обособлению и формированию клинической гепатологии способствовало и то, что именно с середины 60-х гг XX в началась "расшифровка" этиологии вирусных гепатитов и углубленное изучение каждой из этих инфекций.

Соответственно, разделы гепатологии, посвященные этим вопросам, постоянно увеличивались - это привело к формированию крупной части данной дисциплины, связанной с вирусными гепатитами. В итоге, гепатология, помимо разделов, относящихся к циррозам печени, врожденным и приобретенным гепатозам, аутоиммунным заболеваниям, паразитарным и опухолевым поражениям печени, ныне включает крупные разделы, охватывающие острые и хронические вирусные гепатиты. Эти разделы объединяют под названием "инфекционной" гепатологии [23].

В заключение отметим, что значение успехов лабораторной и инструментальной диагностики в развитии инфекционной гепатологии оказалось наиболее важным, поскольку идентификация возбудителей вирусных гепатитов становилась возможной только на основе применения лабораторных методов постановки этиологического диагноза.

Соответственно можно говорить, что развитие инфекционной гепатологии стало возможным лишь на основе применения методов идентификации соответствующих вирусных инфекций. Однако, хотя значение этих методов лабораторной диагностики в развитии гепатологии исключительно велико, их рассмотрение изначально не входило в число задач, стоявших перед настоящим очерком и потому заслуживает отдельного, специально посвященного им, рассмотрения.

Литература

1. Иванников И.О., Сюткин В.Е., Говорун В.М. Общая гепатология. М.: Макс Пресс, 2002;158 с.
2. Мамедов М.К., Михайлов М.И. Эволюция взглядов на этиологию гепатита: от дискразической теории к вирусной. Биомедицина (Баку). 2003;4:38-43. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/evolyutsiya-vzglyadov-na-etimologiyu-gepatita-ot-diskrazicheskoy-teorii-k-virusnoy>
3. Kuntz E., Kuntz H-D. *Hepatology. Principles and Practice*. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2006;825 p.
4. Van den Berg H., Muller P. Uber eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion auf bilirubin. *Biochem. Z.* 1916;77:90-95.
5. Бондарь З.А. Лабораторная функциональная диагностика печени. Болезни печени и желчных путей. Под ред. Е.М.Тареева. М.: Медицина. 1965;61-102.
6. LaDue J., Wroblewski F., Karmen A. Serum glutamic oxalacetic aminopherase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science*. 1954;120:497-499. DOI: 10.1126/science.120.3117.497
7. Wroblewski F., LaDue J. Serum glutamic oxalacetic transaminase activity as an index of liver cell injury: a preliminary report. *Ann Intern Med*. 1955;43(2):345-60. DOI: 10.7326/0003-4819-43-2-345
8. Wroblewski F., LaDue J. Serum glutamic oxalacetic aminopherase (transaminase) in hepatitis. *J. Amer. Med. Ass.* 1956;160:1130-1134. DOI: 10.1001/jama.1956.02960480030008a
9. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G. Serum enzymes (transaminases, phosphoglucomutase, fumarase) in viral hepatitis during prednisone (delta 1-cortisone) therapy. *Clin Chim Acta*. 1959;4(2):213-20. DOI: 10.1016/0009-8981(59)90132-9.
10. Бекирзаде Г.М., Рзаева Н.Р., Мамедов М.К. Характеристика и клинико-патогенетическое значение энзимологических показателей, используемых в лабораторной диагностике заболеваний печени. Современные достижения азербайджан. медицины. 2012;2:17-28. Режим доступа: http://maamjournal.az/download/dost_n2_2012.pdf

11. Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н. Практическая гепатология. Рига: Звайгзне. 1984;405 с.
12. Шварц В.Я., Ногаллер А.М. Аутоиммунный гепатит. Клиническая медицина. 2013;9:57-61. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/autoimmunnyy-gepatit-1>
13. Walker J., Doniach D., Roitt I., Sherlock S. Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1965;1(7390):827-31. DOI: 10.1016/s0140-6736(65)91372-3.
14. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфафетопротеин. Екатеринбург: УроРАН. 2004;376 с.
15. Roholm K., Iversen P. Changes in the liver in acute epidemic hepatitis (catarrhal jeundice) based on 38 aspiration biopsies. *Acta Pathol. Microb. Scandinavica*. 1939;16:427-442. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.1939.tb06050.x>
16. Mengini G. The needle biopsy of the liver, an effective technical progress. *Sci Med Ital*. 1957;6(2):212-29. PMID: 13568821. (In Italian).
17. Хомерики С.Г., Ильченко Л.Ю., Якимчук Г.Н. и др. Прижизненное морфологическое исследование печени. Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. 2007;2:40-44.
18. Бекирзаде Г.М., Мамедов М.К., Рзаева Н.Р. О современных подходах к оценке морфофункционального состояния печени у больных хроническими вирусными гепатитами. Биомедицина (Баку). 2013;4:3-8. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/o-sovremennyh-podhodah-k-otsenke-morfofunktsionalnogo-sostoyaniya-pecheni-u-bolnyh-hronicheskimi-virusnymi-gepatitami>
19. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981;1(5):431-5. DOI: 10.1002/hep.1840010511.
20. Scheuer P., Standish R., Dhillon A. Scoring of chronic hepatitis. *Clin. Liver. Dis*. 2002;6(2):335-347. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(02\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(02)00009-0)
21. Desmet V., Gerber M., Hoofnagle J. et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994;19(6):1513-20. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.1840190629>
22. Вялов С.С. Скрининговые методы выявления фиброза печени. Архив внутренней медицины. 2012;3:48-57. DOI: <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2012-0-3-48-57>
23. Мамедов М.К., Дадашева А.Э., Кадырова А.А. Важнейшие достижения и перспективные пути дальнейшего развития современной инфекционной гепатологии. Современные достижения азерб. медицины. 2016;2:3-11. Режим доступа: http://maamjournal.az/download/dost_n2_2016.pdf

References

1. Ivannikov I.O., Syutkin V.E., Govorun V.M. *Obshchaya gepatologiya*. M.: Maks Press, 2002;158 с. (In Russian).
2. Mamedov M.K., Mikhailov M.I. Evolyutsiya vzglyadov na etiologiyu gepatita: ot diskrazicheskoi teorii k virusnoi. *Biomedicine (Baku)*. 2003;4:38-43. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/evolyutsiya-vzglyadov-na-etologiyu-gepatita-ot-diskrazicheskoy-teorii-k-virusnoy> (In Russian).
3. Kuntz E., Kuntz H-D. *Hepatology. Principles and Practice*. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2006;825 p.
4. Van den Berg H., Muller P. Uber eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion auf bilirubin. *Biochem. Z*. 1916;77:90-95.
5. Bondar Z.A. *Laboratornaya funktsionalnaya diagnostika pecheni. Bolezni pecheni i zhelchnykh putei*. Eds. E.M.Tareeva. M.: Meditsina. 1965;61-102. (In Russian).
6. LaDue J., Wroblewski F., Karmen A. Serum glutamic oxalacetic aminopherase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science*. 1954;120:497-499. DOI: 10.1126/science.120.3117.497
7. Wroblewski F., LaDue J. Serum glutamic oxalacetic transaminase activity as an index of liver cell injury: a preliminary report. *Ann Intern Med*. 1955;43(2):345-60. DOI: 10.7326/0003-4819-43-2-345
8. Wroblewski F., LaDue J. Serum glutamic oxalacetic aminopherase (transaminase) in hepatitis. *J. Amer. Med. Ass*. 1956;160:1130-1134. DOI: 10.1001/jama.1956.02960480030008a
9. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G. Serum enzymes (transaminases, phosphoglucomutase, fumarase) in viral hepatitis during prednisone (delta 1-cortisone) therapy. *Clin Chim Acta*. 1959;4(2):213-20. DOI: 10.1016/0009-8981(59)90132-9.
10. Bekirzade G.M., Rzaeva H.R., Mamedov M.K. Characteristic and clinical and pathogenetical significance of enzymological parameters applicated in laborator diagnostics of liver diseases. *Modern Achievem. Azerb. Med*. 2012;2:17-28. Available at: http://maamjournal.az/download/dost_n2_2012.pdf (In Russian).

11. Blyuger A.F., Hovitskii I.H. *Prakticheskaya gepatologiya*. Riga: Zvaigzne. 1984;405 p. (In Russian).
12. Shvartz V.Ya., Nogaller A.M. Autoimmune hepatitis. *Klinicheskaya Meditsina*. 2013;9:57-61. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/autoimmunnyy-gepatit-1> (In Russian).
13. Walker J., Doniach D., Roitt I., Sherlock S. Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1965;1(7390):827-31. DOI: 10.1016/s0140-6736(65)91372-3.
14. Chereshev V.A., Rodionov S.Yu., Cherkasov V.A. et al. *Alfafetoprotein*. Ekaterinburg: UroRAN. 2004;376 p. (In Russian).
15. Roholm K., Iversen P. Changes in the liver in acute epidemic hepatitis (catarrhal jeundice) based on 38 aspiration biopsies. *Acta Pathol. Microb. Scandinavica*. 1939;16:427-442. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.1939.tb06050.x>
16. Mengini G. The needle biopsy of the liver, an effective technical progress. *Sci Med Ital*. 1957;6(2):212-29. PMID: 13568821. (In Italian).
17. Khomeriki S.G., Ilchenko L.Yu., Yakimchuk G.N. et al. *Prizhiznennoe morfologicheskoe issledovanie pecheni. Eksperim. i klinich. gastroenterologiya*. 2007;2:40-44. (In Russian).
18. Bekirzade G.M., Mamedov M.K., Rzayeva H.R. About modern approaches to estimation of the liver's morphofunctional condition at chronic viral hepatitis patients. *Biomedicine (Baku)*. 2013;4:3-8. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/o-sovremennyh-podhodah-k-otsenke-morfofunktsionalnogo-sostoyaniya-pecheni-u-bolnyh-hronicheskimi-virusnymi-gepatitami> (In Russian).
19. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981;1(5):431-5. DOI: 10.1002/hep.1840010511.
20. Scheuer P., Standish R., Dhillon A. Scoring of chronic hepatitis. *Clin. Liver. Dis*. 2002;6(2):335-347. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(02\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(02)00009-0)
21. Desmet V., Gerber M., Hoofnagle J. et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994;19(6):1513-20. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.1840190629>
22. Vyalov S.S. *Skriningovye metody viyavleniya fibroza pecheni*. The Russian Archives of Internal Medicine. 2012;3:48-57. 2012;3:48-57. DOI: <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2012-0-3-48-57> (In Russian).
23. Mamedov M.K., Dadasheva A.E., Kadiyova A.A. Most important achievements and perspective ways of further development of infectious hepatology. *Modern Achievem. Azerb. Med*. 2016;2:3-11. Available at: http://maamjournal.az/download/dost_n2_2016.pdf (In Russian).

Информация о соавторах:

М.К.Мамедов

Профессор, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Национальный центр онкологии, г.Баку, Азербайджан. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9777-1914>

Information about co-authors:

Mamedov M.K.

Professor, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9777-1914>

DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11816

К 50-ти летию завершения периода эмпирического изучения этиологии вирусных гепатитов

Сол Кругман: эпидемиологические наблюдения и первые образцы вирусов гепатита А и В

М.К.Мамедов¹, М.И.Михайлов²¹Национальный центр онкологии, г.Баку, Азербайджан;²Институт вакцин и сывороток им И.И.Мечникова, г.Москва, Российская Федерация

Резюме: Очерк посвящен памяти Сола Кругмана, выдающегося американского ученого, который 50 лет назад завершил длительное проспективное наблюдение за распространением среди детей вирусных гепатитов и сумел получить первые образцы крови, содержавшие вирусы гепатита А и В.

Ключевые слова: Сол Кругман, вирус гепатита А, вирус гепатита В, история вирусных гепатитов.

Для цитирования: Мамедов М.К., Михайлов М.И. К 50-ти летию завершения периода эмпирического изучения этиологии вирусных гепатитов / Сол Кругман: эпидемиологические наблюдения и первые образцы вирусов гепатита А и В. Биомедицина (Баку). 2020;18(3):37-41. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11816

Поступила в редакцию: 27.07.2020. Принята в печать: 28.08.2020.

To the 50th anniversary of the completion of period of empirical studying the etiology of viral hepatitis

Saul Krugman: epidemiological observations and first specimens of hepatitis A and B viruses

Mamedov M.K.¹, Mikhailov M.I.²¹National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan;²Center for Control of Particularly Dangerous Infections, Baku, Azerbaijan

Abstract: The essay is dedicated to memory of Saul Krugman, eminent American physician who 50 years ago finished carrying out prolonged prospective observation for spreading of viral hepatitis among and was able to obtain first blood specimens contained hepatitis A and B.

Key words: Saul Krugman, hepatitis A virus, hepatitis B virus, history of viral hepatitis.

For citation: Mamedov M.K., Mikhailov M.I. To the 50th anniversary of the completion of period of empirical studying the etiology of viral hepatitis / Saul Krugman: epidemiological observations and first specimens of hepatitis A and B viruses. Biomedicine (Baku). 2020;18(3):37-41. DOI: 10.24411/1815-3917-2020-11816

Received: 27.07.2020. Accepted: 28.08.2020.

Для корреспонденции:**М.К.Мамедов**

Профессор, доктор медицинских наук, заместитель Генерального директора, Национальный центр онкологии, г.Баку, Азербайджан.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9777-1914>

E-mail: m.mamedov@inbox.ru

Corresponding author:**Mamedov M.K.**

Professor, Doctor of Medical Sciences, Deputy General Director, National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9777-1914>

E-mail: m.mamedov@inbox.ru

Интенсивность продолжавшейся много лет дискуссии по вопросу о этиологии инфекционного гепатита снизилась лишь после публикации результатов эпидемиологических наблюдений, проведенных в 1943-1945 гг. англо-американскими исследователями, которые наблюдали за волонтерами, экспериментально зараженными разными биологическими материалами, полученными у больных гепатитом. Несмотря на невысокий методический уровень этих наблюдений, они позволили получить ценнейший для того времени материал, анализ которого и привел ученых к окончательному выводу о том, что это заболевание вызывается вирусом, не патогенным для обычных лабораторных животных. Этот факт был важнейшей вехой на пути к окончательной расшифровке этиологии эпидемического гепатита [1].

Вместе с тем, результаты этих наблюдений косвенно указывали на существование двух этиологически обособленных типов вирусного гепатита, отличающихся по ряду клинико-эпидемиологических особенностей и на отсутствие перекрестного иммунитета между этими типами заболевания. При этом были установлены два эпидемиологически значимых критерия, отличавших эти заболевания друг от друга. Во-первых, первое заболевание имело более короткий, а второе более длинный инкубационный период. И, во-вторых, возбудитель первого заболевания присутствовал, в основном, в фекалиях, а возбудитель второго находился, преимущественно, в крови. Поэтому первое заболевание легче передавалось при пероральном инфицировании, а второе - после парентерального заражения. В 1947 г. было предложено вирусный гепатит с коротким инкубационным периодом и передающийся фекально-оральным путем назвать "гепатитом А" (ГА), а гепатит с длинным инкубационным периодом называть "гепатитом В" (ГВ) [2].

После окончания войны был предпринят ряд исследований, направленных на идентификацию вирусов этих гепатитов. Однако, в 1954 г. на Международном симпозиуме, проведенном Национальной Академией Наук США вместе с Эпидемиологическим управлением вооруженных сил США было признано, что несмотря на все усилия обнаружить предполагаемые вирусы с помощью морфологических и культуральных методов не удалось.

Это обстоятельство усилило позиции ряда и, в том числе, авторитетных ученых, считавших возможность существования 2 этиологически обособленных типов вирусного гепатита маловероятной. Они полагали, что едва ли могло существовать самостоятельное инфекционное заболевание, возбу-

дитель которого распространялся только лишь инъекционным путем, тем более, что инъекционный метод в медицине к тому моменту использовался в течение лишь 100 лет.

Эти ученые различие в продолжительности инкубационных периодов гепатитов считали результатом попадания в организм разных доз вируса, полагая, что при сывороточном гепатите (т.е. ГВ) вирус попадает в организм в меньшей дозе и в ослабленном виде, тогда как при инфекционном гепатите (т.е. ГА) реализуется естественный (энтеральный) путь заражения, при котором вирус проникает в организм более активным и в большем количестве. Отсутствие же перекрестного иммунитета между двумя типами гепатита объясняли существованием лишь разных серотипов одного и того же вируса - возбудителя гепатита. Иначе говоря, эти исследователи фактически отрицали нозологическую самостоятельность сывороточного гепатита, рассматривая его как частный случай инфекционного гепатита [1].

Эта точка зрения нашла отражение в изданной в 1957 г. Международной классификации болезней 7-го пересмотра, в которой инфекционный гепатит (т.е. ГА) фигурировал как самостоятельная инфекционная болезнь, а сывороточный гепатит (т.е. ГВ) был включен в раздел осложнение медицинских процедур и, рассматривался как результат атипичного (необычного) пути попадания в организм вируса.

Решающую роль в доказательстве обоснованности представления о существовании двух этиологически самостоятельных типов вирусного гепатита в тот период сыграли необычайно тщательно выполненные на протяжении почти 15 лет эпидемиологические наблюдения и эксперименты по заражению людей, проведенные в 50-60 гг. XX в.

Эти исследования были проведены Солом Кругманом (Saul Krugman), родившимся в г. Нью-Йорке сыном еврейского эмигранта из России, которой занявшись медициной, стал крупным ученым и одним из самых авторитетных американских педиатров XX в.

С.Кругман (1911-1995) учился в университетах Огайо и Нью-Йорка и в 1939 г. став врачом, работал в военно-воздушных силах США на Тихом Океане. В 1946 г. он стал педиатром на медицинском факультете Нью-Йоркского университета, в 1956 г. - стал ассоциированным профессором, а в 1960 г. - полным профессором этого университета. В 1955 г. он начал свои, принесшие ему мировую известность, научные исследования по вирусному гепатиту, которые он проводил в государственной школе Уиллоубрук (Willowbrook state school) для умственно отсталых детей.



**Сол Кругман
(1911-1995)**

Здесь он руководил многолетним исследованием, а ему помогали доктор Джоан Джайлс, Джек Хаммонд и другие коллеги. Кроме того, в планировании части исследований принимал непосредственное участие и сотрудник Йельского университета Роберт Уэйн МакКоллум (Robert Wayne McCollum).

Уиллоубрукская школа (Willowbrook state school) для умственно отсталых детей была открыта в Нью-Йорке еще в 1947 г и разместилась в нескольких зданиях, расположенных в районе Ситатен-Айленд. Здесь жили порядка 5 тыс детей от 3 до 14 лет. Однако, санитарно-гигиенические условия жизни здесь были крайне неудовлетворительными и среди детей ежегодно отмечались эпидемические вспышки гепатита.

Именно это обстоятельство привлекло внимание Кругмана и его коллег и побудило их с целью выяснения особенностей распространения гепатита в 1955 г начать проспективно-эпидемиологическое наблюдение за детьми, находящимися в этой школе, которое, в итоге, "затянулось" почти на 15 лет.

Не детализируя методы, использованные учеными и сегодня имеющие лишь научно-историческое значение, отметим лишь главные моменты. Поскольку, тогда лабораторная диагностика вирусных гепатитов не существовала, единственной возможностью исследовать особенности распространения инфекций в естественных условиях оставался хорошо продуманный и тщательно проведенный ретроспективный эпидемиологический ана-

лиз каждого из случаев заболеваний.

В частности, в период вспышек исследователи прослеживали всю "цепочку" связанных с самым первым и всеми последующими заболеваниями. Существенный момент наблюдения состоял и в том, дети, заболевавшие гепатитом повторно, были выделены в самостоятельную группу - в этой группе ретроспективный анализ динамики распространения инфекций проводился отдельно. За весь период исследования под наблюдением ученых находилось порядка 700 детей.

Более того, в период своего наблюдения исследователи целенаправленно использовали согласованную с родителями серию запланированных экспериментальных заражений 272 детей (как интактных, так и ранее переболевших гепатитом) путем либо кормления их шоколадным молоком, содержащим суспензию фекалий заболевших детей, либо парентерального введения им сывороток крови больных детей.

На основе глубокого анализа результатов этих наблюдений ученые пришли к неопровержимому заключению о том, что среди детей циркулировал не один, а два разных вируса, иммунологически отличавшихся друг от друга. Более того, в наблюдениях Кругмана были получены сведения о преимущественных путях передачи этих вирусов и длительности инкубационного периода при каждой из этих инфекций. Важно, что основные сведения об инфекциях, полученные группой Кругмана, полностью совпали с соответствующими данными, ранее полученными упоминавшейся выше англо-американской группой ученых, проводивших в середине 40-х гг натурные наблюдения на волонтерах.

Наблюдая за случаями повторных заболеваний детей ученые установили, что дети, переболевшие одним типом гепатита, становились нечувствительными к этой же инфекции, но могли быть заражены другим типом гепатита. Иначе говоря, Кругман с коллегами вновь подтвердили существование впервые обнаруженного англо-американской группой ученых иммунологического различия между двумя типами вирусного гепатита.

В процессе наблюдения за детьми, исследователи идентифицировали две эпидемиологически связанные между собой группы пациентов: детей, больных инфекционным гепатитом и детей, больных сывороточным гепатитом. Собирая у них кровь и содержимое кишечника и сохраняя их, они уже в 1965 г без использования каких-либо лабораторных методов сумели получить два типа образцов биологических материалов, обозначенных как "штаммы" MS-1 и MS-2, которые, как бы-

ло установлено позднее, являлись образцами возбудителей вируса ГА (ВГА) и вируса ГВ (ВГА), соответственно [3, 4, 5].

Надо особо подчеркнуть, что эти образцы плазмы крови детей более 5 лет оставались единственно охарактеризованными вирусосодержащими материалами, которые в качестве эталонных образцов использовались в экспериментах как на обезьянах, так и на людях и, в частности, в процессе идентификации ВГА и ВГВ.

Так, уже в 1966 г "штамм" MS-1 (дуоденальное содержимое и фекалии) был передан работавшему в то время в г.Чикаго немецкому патологу Фридриху Дейнхарду, который используя этот материал, сумел инфицировать им обезьян-мармозетов и воспроизвести у них биохимическую картину инфекционного гепатита [6]. Более того, в проведенном в 1973 г наблюдении, в котором С.Фейнстоун и его коллеги впервые визуализировали ВГА, его частицы были обнаружены как в материалах от больных гепатитом и инфицированных обезьян, так и в материале MS-1 [7]. В 1969 г "штамм" MS-2 (пул плазмы и крови) был передан английским вирусологам, которые в 1970 г с помощью электронного микроскопа выявили в нем "частицы Дейна", т.е. частицы ВГВ [8].

Наконец, полученные Кругманом результаты для того времени имели важное практическое значение. В частности, на основе анализа повторных случаев заболеваний гепатитами и результатов экспериментального заражения детей обоими типами гепатита, он впервые разработал концепцию иммунопрофилактики этих инфекций и с помощью простой методики (длительное прогревание в водяной бане) изготовил пробные образцы соответствующих препаратов. В 1970 г он сообщил, что гамма-глобулин, выделенный из сывороток крови переболевших детей, оказывал протективный эффект и мог применяться для пассивной профилактики этих инфекций. Уже в 1971 г он доказал, что прогретые "штаммы" вирусов MS-1 и MS-2 могут считаться примитивными вакцинными препаратами для активной иммунизации против вирусных гепатитов [9, 10].

Сегодня признается, что принадлежащее Кругману исследование, указавшее на принципиальную возможность не только пассивной, но и активной иммунопрофилактики вирусных гепатитов, оказались первым и существенным вкладом в теоретическую основу разработки вакцинных препаратов. Авторитетные ученые считают, что скорее всего эти исследования заметно ускорили появление таких вакцин.

Нельзя не отметить, что исследования, прово-

дившиеся в школе Уиллоубрук уже с середины 60-х гг XX в подвергались серьезной общественной критике из-за проведения на детях опытов, противоречащих этическим нормам. Именно эта критика в итоге привела к скандалу, после которого, в 1987 г эта школа была закрыта, а ее территория передана Колледжу Статен-айленд.

Однако, мировое научное сообщество, как и крупные ученые США, считали, что вклад, внесенный Кругманом и его коллегами в развитие медицины и науки был настолько весом, что этические издержки его исследований не должны повлиять на репутацию ученого и, в итоге, скандал не снизил его профессиональный авторитет.

Он до конца жизни оставался профессором Нью-Йоркского университета, а с 1972 г был Президентом Американского общества педиатров и автором известного учебника по инфекционным болезням детей. Несколько лет он занимал ряд высоких общественно-научных постов и, к примеру, возглавлял комиссию FDA по вакцинам. И, наконец, в 1976 г он был избран членом Национальной академии наук США.

Кругман был удостоен ряда медалей и престижных премий: в 1978 г Золотой медали фонда Р.Коха, в 1981 г премии и медали Джона Хауленда общества педиатров США, в 1982 г - золотой медали Красного креста США; в 1983 г - премии Ласкера и в 1985 г - мемориальной премии Карла Ландштейнера.

Уместно отметить и то, что и проводивший исследования вместе с Кругманом Р.У.МакКоллум (1925-2010) в последние годы стал профессором Йельского университета и известным американским ученым, добившимся немалых успехов в изучении эпидемиологии не только вирусных гепатитов, но и полиомиелита и других вирусных инфекций.

Завершая этот небольшой очерк, посвященный одному из важных и ценных в научном отношении многолетних и трудоемких исследований в истории изучения этиологии вирусных гепатитов, сегодня можно утверждать, что осуществившие его ученые только на основе тщательно проведенных натурных наблюдений смогли не только окончательно подтвердить существование ГА и ГВ и продемонстрировать некоторые важные особенности этих инфекций, но и показать пути разработки средств для иммунопрофилактики этих инфекций.

Более того, они без использования специальных лабораторных методик сумели получить образцы соответствующих вирусов, использование которых способствовало ускорению дальнейшего изучения вирусных гепатитов.

Окончание этого исследования по времени практически совпало с визуализацией возбудителей вирусных гепатитов. Поэтому, можно говорить о том, что завершение этого исследования в самом

начале 70-х гг XX в ознаменовало окончание периода эмпирического изучения этиологии вирусных гепатитов.

Литература / References

1. Zuckerman A., Howard C. Hepatitis viruses of man. London: Acad.Press, 1979, p.15-27.
2. MacCallum FO. 1971 International Symposium on Viral Hepatitis. Historical perspectives. Can Med Assoc J. 1972;106(Spec Issue):423-426. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1945125/>
3. Krugman S., Ward R., Giles J., Jacobs A. Experimental transmission and trial of passive-active immunity in viral hepatitis. AMA. Journal of Diseases of Children. 1957;94:409-411.
4. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious Hepatitis: Evidence for Two Distinctive Clinical, Epidemiological, and Immunological Types of Infection. JAMA. 1967;200(5):365-373. DOI: 10.1001/jama.1967.03120180053006.
5. Giles JP, McCollum RW, Berndtson LW Jr, Krugman S. Relation of Australia-SH antigen to the willow-brook MS-2 strain. N Engl J Med. 1969;281(3):119-22. DOI: 10.1056/NEJM196907172810302.
6. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. J Exp Med. 1967;125(4):673-88. DOI: 10.1084/jem.125.4.673.
7. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. Science. 1973;182(4116):1026-8. DOI: 10.1126/science.182.4116.1026.
8. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet. 1970;1(7649):695-8. DOI: 10.1016/s0140-6736(70)90926-8.
9. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Hepatitis virus: effect of heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strains. J Infect Dis. 1970;122(5):432-6. doi: 10.1093/infdis/122.5.432.
10. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Studies on active immunization. JAMA. 1971;217(1):41-5. DOI: 10.1001/jama.1971.03190010023005.

Информация о соавторах:

М.И.Михайлов

Член-корреспондент Российской академии наук, профессор, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией вирусных гепатитов, НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, г.Москва, Российская Федерация.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Information about co-authors:

Mikhailov M.I.

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Medical Sciences, Chief of Viral Hepatitis Laboratory, I.I.Mechnikov's Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, Russian Federation.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

ХРОНИКА

К ЮБИЛЕЮ ПРОФЕССОРА АГИГАТ КАДЫРОВОЙ



Редакционная коллегия журнала "Биомедицина" сердечно поздравляет с Юбилеем доктора медицинских наук, профессора Агигат Абдул кызы Кадырову, известного азербайджанского ученого и организатора медицинской науки, заместителя главного редактора журнала "Биомедицина".

Окончив с отличием лечебный факультет Азербайджанского медицинского института им.Н.Нариманова, она поступила в аспирантуру при Институте вирусологии им. Д.И.Ивановского в г.Москве по специальности "вирусология" и в итоге защитила кандидатскую диссертацию, посвященную проблеме интерферона.

Вернувшись в г.Баку, свою профессиональную деятельность она связала с Азербайджанским медицинским университетом (АМУ) и посвятила ее обучению студентов основам микробиологии и вирусологии. Здесь, на профильной кафедре ею было подготовлено и опубликовано первое на азербайджанском языке учебное пособие по вирусологии для студентов.

На этой стезе А.А.Кадырова, всегда остававшаяся превосходно образованным и требовательным педагогом и принципиальным, но объективным и чрезвычайно доброжелательным человеком, завоевала уважение коллег и большую любовь студентов, многие из которых даже после окончания университета вновь и вновь обращались к любимому учителю за советом и помощью.

Эти же качества, вместе с широкой эрудицией и профессионализмом, ярко проявились и в период, когда А.А.Кадырова возглавляла отдел медицины и биологии в Высшей Аттестационной комиссии при Президенте Азербайджанской Республики. Несмотря на большую педагогическую и административную работу и общественную нагрузку, она не прекращала научные исследования, которые логично вылились в ее блестяще защищенную докторскую диссертацию, посвященную проблеме врожденного иммунитета при вирусных инфекциях.

В дальнейшем она, не прекращая своей педагогической деятельности, в течение нескольких лет успешно возглавляла Республиканский центр по борьбе со СПИД, а в настоящее время является директором НИИ легочных болезней. На этих позициях она, будучи человеком, требовательным к коллегам и, прежде всего, к себе самой, проявила и недюжинные организаторские способности и сумела поднять работу этих учреждений на уровень лучших международных стандартов, завоевав большой профессиональный авторитет не только на Родине, но и среди коллег из других стран. Она избрана член-корреспондентом Международной экоэнергетической академии и ряда других международных авторитетных научных обществ.

Перу А.А.Кадыровой принадлежат 4 книги, в том числе, 2 научные монографии, изданные за пределами нашей страны. Она является автором около 300 научных работ, опубликованных в Азербайджане и за его рубежами. Она подготовила несколько молодых ученых, успешно работающих в медицинских учреждениях страны. Сегодня, будучи заведующей кафедрой медицинской микробиологии и иммунологии АМУ, она не только читает лекции и ведет семинары, но и продолжает научные исследования и кропотливую работу по подготовке молодых ученых.

Мы, ее коллеги, ученики и друзья, искренне ценим и любим Агигат-ханум, большого ученого по призванию и педагога от Бога, честного и принципиального, но при этом, утонченного и доброго человека, чуткого и отзывчивого друга, и желаем ей крепкого здоровья и больших успехов в ее многогранной деятельности.