

УДК 616.981.21-092.19:578.72:579.862.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118>

Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности *Streptococcus pyogenes*

Фрейдлин И.С.^{1,2}, Старикова Э.А.¹, Лебедева А.М.¹

¹ Институт экспериментальной медицины
Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет (ПСПбГМУ) имени академика И.П. Павлова
197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8

РЕЗЮМЕ

Обзор посвящен анализу молекулярных механизмов действия факторов вирулентности *S. pyogenes*, направленных на преодоление защитных функций макрофагов. Подробно описаны основные защитные функции макрофагов и механизмы их реализации в ходе развития стрептококковой инфекции. Рассмотрены факторы вирулентности *S. pyogenes*, препятствующие рекрутированию макрофагов в очаг инфекции. Особое внимание уделено анализу молекулярных механизмов подавления патогеном процесса фагоцитоза, внутриклеточной бактерицидности и продукции цитокинов макрофагами. Проведен анализ молекулярно-генетических механизмов регуляции экспрессии факторов вирулентности *S. pyogenes*, обеспечивающих адаптацию патогена к меняющимся условиям в очаге воспаления.

Ключевые слова: макрофаги, стрептококковая инфекция, *S. pyogenes*, фагоцитоз, бактерицидность.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00150.

Для цитирования: Фрейдлин И.С., Старикова Э.А., Лебедева А.М. Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности *Streptococcus pyogenes*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 109–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118>.

УДК 616.981.21-092.19:578.72:579.862.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118>

Overcoming the protective functions of macrophages by *Streptococcus pyogenes* virulence factors

Freydlin I.S.^{1,2}, Starikova E.A.¹, Lebedeva A.M.¹

¹ Institute of Experimental Medicine
12, Akademika Pavlova Str., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

✉ Фрейдлин Ирина Соломоновна, e-mail: irinaf-n@yandex.ru.

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
6-8, L'va Tolstogo Str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

ABSTRACT

The review is devoted to the analysis of molecular mechanisms of action of *S. pyogenes* virulence factors aimed at overcoming the protective functions of macrophages. The review describes in detail the main protective functions of macrophages and the mechanisms of their implementation in the course of streptococcal infection. The virulence factors of *S. pyogenes*, which prevent the recruitment of macrophages to the site of infection, are examined. Particular attention is paid to the analysis of molecular effects that suppress the pathogen by the process of phagocytosis, intracellular bactericidal activity and the production of cytokines by macrophages. The analysis of molecular genetic mechanisms of regulation of the expression of *S. pyogenes* virulence factors that provide adaptation of the pathogen to changing conditions in the site of inflammation is carried out.

Key words: macrophages, streptococcal infection, *S. pyogenes*, phagocytosis, bactericidal activity.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by the RFBR grant No. 16-04-00150.

For citation: Freydlin I.S., Starikova E.A., Lebedeva A.M. Overcoming the protective functions of macrophages by *Streptococcus pyogenes* virulence factors. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 109–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118>.

ВВЕДЕНИЕ

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*) – стрептококк группы А (GAS), является патогеном исключительно для человека. Стрептококковые инфекции и вызываемые ими осложнения входят в первую десятку основных причин смертности от инфекций во всем мире. Ежегодно GAS вызывает 700 млн инфекций, в том числе 1,8 млн инвазивных. GAS в основном является возбудителем инфекций средней тяжести с поражением кожи и слизистых: фарингит, скарлатина, рожа, пиодермия (импетиго). Значительно реже стрептококковая инфекция приводит к тяжелым заболеваниям: сепсису, пневмонии, менингиту, синдрому токсического шока, некротизирующему фасцииту. Кроме того, доказана пусковая роль GAS в развитии аутоиммунных заболеваний: ревматической лихорадки, гломерулонефрита, реактивных артритов. *S. pyogenes* может оставаться в состоянии носительства. У 30% людей выявлена колонизация стрептококком носоглотки. С середины 1980-х гг. повысилось число случаев тяжелых системных стрептококковых инфекций, вызванных GAS серотипов М1 и М3. Выделение одних и тех же штаммов при инфекциях разной степени тяжести свидетельствует о зависимости тяжести инфекций и их исходов от полноценности механизмов защиты организма хозяина.

Пиогенные стрептококки относят к внеклеточно паразитирующим бактериям, высокая па-

тогенность которых связана с быстрыми темпами размножения и с наличием множества факторов вирулентности, направленных на преодоление и нейтрализацию эффекторных функций клеток врожденного иммунитета организма-хозяина. Входными воротами инфекции GAS чаще всего служат эпителий слизистой носоглотки или кожа, что определяется тропностью стрептококков к этим тканям. Когда стрептококк преодолевает эпителиальный барьер, в субэпителиальной соединительной ткани он встречается с макрофагами (Мф), которые образуют первую линию защиты от патогена. Макрофаги экспрессируют широкий спектр рецепторов для распознавания консервативных структур бактерий (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), что объясняет их способность инициировать воспаление и иммунный ответ. Эти клетки способны элиминировать патогены путем фагоцитоза и выполняют функцию антигенпрезентации при формировании адаптивного ответа на инфекцию [1].

Ведущая защитная роль макрофагов при стрептококковой инфекции была доказана в нескольких сериях экспериментов с искусственным удалением Мф из организма мышей. Удаление CCR2-положительных макрофагов с помощью дифтерийного токсина приводило к усилению диссеминации GAS и повышению летальности зараженных животных [2, 3]. Системная деплеция Мф с помощью хлордроната или использование

трансгенных CCR2-дефектных мышей сильно повышали диссеминацию GAS в мягких тканях независимо от сохранности рекрутирования полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ). Повышенную диссеминацию GAS удавалось ревертировать при внутривенном введении моноцитов (Мн) или внутрибрюшинном введении перитонеальных Мф. При моделировании у мышей недостаточности Мф каррагинаном или гадолинием III хлоридом была выявлена следующая закономерность: мыши становились высокочувствительны к GAS в случае удаления Мф до заражения или в первые 24 ч после заражения [2]. У дефицитных по цитокину – фактору некроза опухоли альфа (TNF α) – мышей не происходило рекрутирования Мф в очаг инфекции, хотя инфильтрация ПЯЛ была не нарушена. Показана зависимость диссеминации GAS от TNF α , так как резидентные Мф нуждались в помощи Мн, рекрутированных при участии TNF α [4].

Во многом благодаря реализации эффекторного и регуляторного потенциала макрофагов, после преодоления эпителиального барьера стрептококки чаще всего подвергаются элиминации. Однако вирулентными штаммами стрептококков выработаны механизмы, позволяющие противодействовать макрофагам на всех этапах реализации их защитных функций: блокировать действие хемоаттрактантных факторов, ингибировать фагоцитоз или способствовать инвазии в клетки организма-хозяина и внутриклеточному выживанию [1].

Способность GAS вызывать системные инфекции зависит от его устойчивости к факторам врожденного иммунитета, препятствующим его диссеминации, к которым относятся фагоцитирующие клетки: гранулоциты и макрофаги. При использовании биоинформационного анализа полного генома *S. pyogenes* были идентифицированы гены, ответственные за способность GAS нарушать процессы рекрутирования фагоцитов, ингибировать участие комплемента и антител в опсонизации, подавлять механизмы захвата бактерий, противостоять факторам бактерицидности, регулировать апоптоз фагоцитов [5].

ПРЕПЯТСТВИЕ РЕКРУТИРОВАНИЮ МАКРОФАГОВ В ОЧАГ ИНФЕКЦИИ

При биопсии, взятой у пациентов с генерализованной инфекцией GAS, было показано присутствие содержащих GAS Мф в очаге инфекции. [2, 6]. Моноциты мигрируют в очаг инфекции по градиенту концентрации соответствующих хемоаттрактантов. Функции хемоаттрактантов могут выполнять компоненты и продукты деградации микроорганизмов, продукты деструкции тканей

организма-хозяина, активированная фракция комплемента C5a или молекулы цитокинов семейства хемокинов, в первую очередь IL8. Патогенные GAS обладают факторами вирулентности, разрушающими отдельные хемоаттрактанты или угнетающими их активность. Стрептококковые мембран-связанные протеолитические ферменты C5a-пептидаза (ScpA) и сериновая протеаза (SpyCER) инактивируют компонент комплемента C5a, препятствуя хемотаксису и рекрутированию клеток в очаг инфекции. Мутация гена, контролирующего экспрессию C5a-пептидазы, повышает темпы очищения организма зараженных подкожно мышей от стрептококка [7]. Кроме того, GAS экспрессируют поверхностно-ассоциированный C5a-связывающий протеин (C5aBP), способный разрушать C5a компонент системы комплемента [8]. Стрептококковая сериновая протеаза SpyCER катализирует расщепление и инактивацию хемокинов IL-8, KC, MIP-2 [5].

ВМЕШАТЕЛЬСТВО В МЕХАНИЗМЫ ФАГОЦИТОЗА МАКРОФАГОВ

Рецепторы макрофагов, участвующие в фагоцитозе, принято делить на опсонические (CR – рецепторы белков комплемента и FcR – рецепторы Fc-фрагментов молекул иммуноглобулинов) и неопсонические, которые связываются непосредственно с лигандами в составе бактерий. К неопсоническим относятся: семейство паттерн-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRR), лектины, маннозные рецепторы (MR), рецепторы β -глюкана (дектин-1), SR-A, MARCO. PRR, в том числе toll-like receptors (TLR), распознают и связывают бактериальные паттерны (PAMP), к которым относятся компоненты клеточной стенки стрептококка (липопротеины, липопептиды, пептидогликаны, липотейхоевая кислота), являющиеся лигандами TLR2.

Когда TLR2 связывают PAMP стрептококков, активируются факторы транскрипции nuclear factor-kappa B (NF κ B) и семейства IRF. Передача сигнала от TLR в клетку осуществляется преимущественно, через сигнальный адаптер myeloid differentiation factor 88 (MyD88). Показана необходимость MyD88 для запуска воспалительного ответа на GAS. При дефиците MyD88 у фагоцитирующих клеток драматически снижена продукция фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина (IL) 6, IL-12, интерферона (IFN) типа I. MyD88 опосредует рекрутирование Мф в очаг и предупреждает инвазирование бактерий [9]. В распознавании PAMP стрептококка важную роль играют внутри-

клеточные паттерн-распознающие рецепторы – NOD-подобные рецепторы (NLRs). Пептидогликаны клеточной стенки бактерий являются лигандами поверхностных TLR2, однако после захвата бактерий в цитоплазме Мф от пептидогликанов отщепляется мурамилдипептид (MDP), который связывается с nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), что является дополнительным фактором активации инфламмасом [10].

PRRs играют главную роль в распознавании бактерий, индукции провоспалительного сигнала и продукции цитокинов, но не участвуют непосредственно в фагоцитозе. Фагоцитарными рецепторами служат опсонические рецепторы CR и FcR, а из неопсонических – MR и SR-A. Мф экспрессируют полный набор Fcγ-рецепторов – FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16) и рецепторы для компонентов комплемента, которые распознают фрагменты C3b и C3d – CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18, или Mac-1) и CR4 (CD11c/CD18, или p150,95). CR3 связываются с C3-лигандами, образующимися при активации системы комплемента, и опосредуют миграцию и фагоцитоз. Связывание с FcR опсонизирующих антител ведет к активации внутриклеточных тирозин-киназ, индукции респираторного взрыва и продукции метаболитов арахидоновой кислоты.

Антифагоцитарную защиту стрептококка обеспечивает капсула, которая состоит из полимеров высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (НА) или гиалурона и N-ацетилглюкозамина. Капсула является одним из факторов адгезии и инвазии стрептококка и создает физический барьер, препятствующий доступу фагоцитов к бактериальным клеткам. Нативная капсульная гиалуроновая кислота ингибирует захват бактерий Мф и повышает выживаемость GAS в организме мышей. Частичная деградация НА стрептококковой гиалуронидазой повышала захват GAS Мф *in vitro* и лимитировала развитие инфекции у мышей [8]. При инфекции высокомолекулярная НА превращается в низкомолекулярные продукты деградации, которые в отличие от нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты не снижают захват GAS Мф и не повышают их выживания в крови. Поэтому генерация короткоцепочечных фрагментов НА может играть протективную роль при инфекции [11].

Компоненты клеточной поверхности стрептококков, такие как М- и Т-протеины, связывающие фибронектин, ламинин, могут препятствовать захвату бактерий. GAS использует различные белки матрикса (фибронектин, коллаген) для формирования крупных агрегатов, превосходящих размеры, доступные для фагоцитоза. Секретируемый

GAS мультифункциональный белок SIC нарушает биофизические процессы, необходимые для фагоцитоза [8]. Проведенное исследование *in vitro* показало, что белок M111 *S. pyogenes* обладает антифагоцитарными свойствами [12].

На поверхности стрептококка экспрессирован фермент энолаза, участвующий в связывании плазмина. Другим белком, связывающим плазмин, является секретируемая стрептококками стрептокиназа (Ska), обладающая фибринолитическими свойствами. Протеаза Ska превращает плазминоген в плазмин, который откладывается на поверхности GAS, препятствует фагоцитозу и способствует диссеминации бактерий [8].

Фибронектин и другие белки на поверхности стрептококка препятствуют связыванию CR3 и FcR с их лигандами. Система комплемента имеет механизм саморегуляции: белок C4BP и фактор FH для ограничения активации комплемента. GAS обладает способностью связывать эти белки и препятствовать опсонофагоцитозу. Фибриллярный поверхностный белок GAS М-протеин связывается с C4BP и FH-фактором H, что препятствует отложению C3b на поверхности бактерий. М-протеин, связывая фибриноген, снижает активность C3-конвертазы при классическом пути активации комплемента [7]. GAS имеет несколько поверхностных белков, способных связывать фибронектин FBPs, которые способствуют избеганию фагоцитоза GAS путем ингибиции активности комплемента. M1-серотип GAS секретирует протеиновый сывороточный ингибитор SIC, угнетающий комплемент-опосредованный лизис бактерий и участвующий в обеспечении резистентности к фагоцитозу [4]. Молекула CD46, которая экспрессирована на поверхности моноцитов, принадлежит к семейству регуляторов активности комплемента и инактивирует белки C3b и C4b системы комплемента. М-протеин GAS способен связываться с CD46 на поверхности клеток, препятствуя опсонофагоцитозу [7].

Сигналинг от CR3 менее эффективен по сравнению с FcR в индукции респираторного взрыва при фагоцитозе. FcR-опосредованный захват бактерий ведет к их транспорту в фагосомы с последующим слиянием с лизосомами, гибелью и разрушением бактерий. Это позволяет считать взаимодействие иммуноглобулинов с FcR наиболее эффективным вариантом опсонизации. GAS использует разные пути препятствия этому варианту опсонизации. GAS продуцирует эндопептидазу immunoglobulin G-degrading enzyme (IdeS) – фермент, специфичный к области hinge молекулы иммуноглобулина (Ig) G, способный интерфери-

ровать с эффекторными функциями IgG, в частности с опсонизацией для фагоцитоза [13]. Продуцируемые бактериями фибронектин-связывающие белки, разные типы М-протеина, Н-протеин связываются с Fc-областью Ig, препятствуя опсонофагоцитозу Мф. Протеазы цистеина Mac-1/Ides способны разрушать все изотипы Ig *in vitro*. Mac2-протеин обладает способностью связываться с FcRII и FcRIII, ингибируя распознавание Ig на поверхности бактерий. Как и Mac-1/Ides, Mac2 проявляет эндопептидазную активность. Секретируемый стрептококками белок EndoS гидролизует гликан в молекуле Ig, препятствуя его распознаванию Fc-рецепторами макрофагов, блокируя классический путь активации комплемента и опсонофагоцитарную реакцию [5].

Недавно было показано, что стрептококковый пирогенный экзотоксин В (Streptococcal pyrogenic exotoxin B, SpeB) является цистеин-протеиназой, препятствующей фагоцитозу за счет протеолитической активности и способности разрушать: гликопротеины матрикса (FN, витронектин, ламинин), IL-1, хемокины, иммуноглобулины, компоненты комплемента и плазминоген организма хозяина, участвующие в опсонизации бактерий. SpeB-дефектные мутанты легче фагоцитировались, а GAS дикого штамма эффективно разрушали C3b [8].

МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ВЫЖИВАНИЯ *S. PYOGENES* В МАКРОФАГАХ

Представление о GAS как о внеклеточно паразитирующей бактерии в настоящее время пересматривается в связи с новыми экспериментальными данными. Показана способность GAS выходить из фагосом в цитоплазму Мф, где они находят более подходящие условия для выживания [5]. Возможность пролиферации *S. pyogenes* в живых человеческих макрофагах на уровне клеточной популяции и на уровне отдельных клеток убедительно доказана в исследовании O'Neill и соавт. [14], в котором показано, что для активной внутриклеточной пролиферации стрептококков важным условием является их выход из фагосом в цитозоль.

Наиболее вирулентные штаммы стрептококка могут длительно выживать внутри макрофагов, которые при этом обеспечивают их защиту от других иммунных механизмов и от действия антибиотиков. Неоднократно выявляли живые *S. pyogenes* в макрофагах из биоптатов пораженных тканей от больных инвазивной инфекцией [6, 15]. Показана способность *S. pyogenes* выходить из Мф с последующим инфицированием других клеток, т. е. МФ могут служить резервуаром диссеминации и продолжения повреждения тканей [15].

Для вирулентных штаммов *S. pyogenes* описано несколько механизмов устойчивости к гибели внутри макрофагов. Экспрессированный на поверхности бактерий М-протеин служит важным фактором, подавляющим созревание фагосом и выживание *S. pyogenes* в Мф человека [15]. Внутриклеточное выживание *S. pyogenes* связано с М-протеин-зависимым нарушением внутриклеточного движения по пути «фагосома – лизосома». Показано участие белка M1 в механизме избегания слияния фагосом, содержащих *S. pyogenes*, с лизосомами макрофагов [16]. Фагоцитарная вакуоль, содержащая экспрессируемые M1 протеин *S. pyogenes*, служит для бактерий нишей выживания и репликации. Нарушение созревания фаголизосом может ограничивать контакт с кислородными радикалами и индукцию окислительного взрыва. Пиогенные стрептококки экспрессируют глутатион пероксидазу GroA, мощный антиоксидантный фактор, позволяющий им адаптироваться к оксидативному стрессу в фаголизосомах [5].

Установлено, что гемолитический экзотоксин стрептолизин О (SLO) ингибирует транспорт бактериальных клеток в фагосомы и облегчает их выход из фагосом в цитозоль [4]. SLO генетически и функционально связан с другим фактором вирулентности стрептококка – NAD-гликогидролазой (NADase), которая является котоксином SLO [4]. Дефицитные по NADase штаммы стрептококков отличаются более низкой вирулентностью в мышинных моделях [17]. Продукция фагоцитированными стрептококками SLO приводит к формированию пор в мембранах фаголизосом, что способствует транслокации NADase в цитозоль МФ. NADase участвует в подавлении созревания фагосом, ингибиции ацидификации фаголизосом и транспорта фагоцитированных бактерий в лизосомы [17, 18].

ПОДАВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ БАКТЕРИЦИДНОСТИ МАКРОФАГОВ

Судьба фагоцитированных бактерий зависит от процесса слияния лизосом с фагосомой, который обеспечивает целенаправленное попадание факторов микробицидности непосредственно в фагосому без повреждения цитоплазматических структур клетки. В благоприятном случае фагоцитированные бактерии погибают через 30–60 мин после захвата под действием факторов микробицидности, к которым относятся образующиеся в ходе респираторного взрыва активные формы кислорода, оксид азота (NO), бактерицидные ферменты (миелопероксидаза, лизоцим), нейтральные протеиназы (эластаза, катепсин G, протеиназа-3), кислые гидролазы (N-ацетил-β-

глюкозаминидаза, катепсин В, катепсин D, β -глюкуронидаза, β -глицерофосфатаза, α -маннозидаза), арилсульфатаза, а также кислые гликозаминогликаны (мукополисахариды). Выживание и длительная персистенция патогена в клетках организма-хозяина возможны при мобилизации патогенными стрептококками разных механизмов подавления факторов микробицидности.

Пиогенные стрептококки, как все молочнокислые бактерии, используют гликолиз для получения энергии и продуцируют лактат как конечный продукт метаболизма. Поэтому закисление окружающей среды является естественным следствием роста этих микроорганизмов [19]. Одним из механизмов, позволяющих стрептококкам адаптироваться к кислотному стрессу, является продукция аммиака и аденозин-трифосфата в реакции гидролиза аргинина, который осуществляет система ферментов аргининдеиминазы (АД) [20]. АД является одним из трех ферментов, осуществляющих конверсию аргинина в орнитин, аммиак и CO_2 , с параллельной продукцией АТФ. Это помогает бактериям преодолевать дефицит кислорода, питательных веществ и выживать в разных биологических нишах [21, 22].

В ряде исследований показано, что АД играет существенную роль для инвазирования и выживания *S. pyogenes* в эпителиальных клетках человека. Так, установлено, что мутантный штамм *S. pyogenes* с делецией гена АД (*arcA*) обладает сниженной способностью к инвазии и внутриклеточному росту по сравнению с исходным штаммом [23]. Исследования *in vitro* на культурах Нер-2С и А549 показали, что мутантный штамм, не экспрессирующий АД, примерно в 3–5 раз слабее инвазировал эпителиальные клетки по сравнению с исходным штаммом. Оба исследуемых штамма *S. pyogenes*, исходный и мутантный, были одинаково чувствительны к низкому рН. Однако аргинин в концентрации 1 мМ достоверно повышал выживаемость в кислой среде только исходного штамма [23, 24].

Несмотря на активные исследования, точные механизмы, благодаря которым АД способствует внутриклеточному выживанию и даже репликации бактерий, до сих пор не ясны [25]. Вероятно, АД препятствует закислению среды в фагосоме благодаря продукции аммиака. Это не только защищает бактерии от потенциально летального действия низких показателей рН, но и препятствует слиянию фагосомы с лизосомой [20, 26]. Нельзя исключать, что АТФ, продуцируемый в рамках системы ферментов АД, служит источником энергии для F1FO-АТФазы, которая поддерживает цитоплазматический кислотно-щелочной баланс за счет активного транспорта протонов из клетки [20, 27].

Среди факторов микробицидности Мф важное место занимает NO. В организме млекопитающих единственным субстратом для генерации NO при участии NO-синтазы (NOS) является аргинин [28], поэтому биодоступность этой аминокислоты является фактором, ограничивающим продукцию NO [29]. За счет деплеции аргинина фермент АД может улучшать условия выживания бактерий в фаголизосомах [25]. В пользу этой гипотезы говорят данные, полученные в наших исследованиях с использованием продуктов ультразвукового разрушения двух штаммов: исходного *S. pyogenes* M49-16 и мутантного *S. pyogenes* M49-16 *delArcA* с инактивированным геном АД (*arcA*). В этих экспериментах показано, что способность стрептококков ингибировать продукцию макрофагами NO зависит от наличия у них аргининдеиминазной активности.

Исходный штамм, экспрессирующий АД и обладающий способностью гидролизовать аргинин из среды, подавлял индуцированную ЛПС продукцию NO макрофагами линии J774. В отличие от этого мутантный штамм *S. pyogenes* M49-16 *delArcA* подобным действием не обладал. При добавлении в среду избытка аргинина, ингибирующего продукцию NO, действие исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 нивелировалось, что явилось дополнительным доказательством зависимости синтеза NO макрофагами от биодоступности субстрата для индуцированной NOS [30].

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ МАКРОФАГАМИ

Распознавание стрептококковых PAMPs с участием TLRs макрофагов ведет к рекрутированию лейкоцитов и усиленной продукции ими провоспалительных цитокинов. Взаимодействие GAS с TLR-2 макрофага запускает каскад внутриклеточных сигналов, ответственных за активацию транскрипционных систем: NF- κ B, IRFs и MAPK. *S. pyogenes* влияет на экспрессию цитокинов с помощью прямой активации транскрипционного фактора NF- κ B или опосредованно через активацию белков STAT.

При распознавании PAMP стрептококка активируются продукция и секреция Мф провоспалительных цитокинов: IL-1, TNF α и хемокинов IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP) 2, MIP-1a, monocyte chemoattractant protein (MCP). Первоначально секретируются хемокины, ответственные за рекрутирование нейтрофилов [31]. Продукты разрушения молекулы пептидогликана распознаются NOD-белками и вовлекаются в активацию транскрипционного фактора NF- κ B. Кроме того, NOD-белки регулируют цистеин-протеазу – каспазу-1, активация которой ведет к уси-

лению продукции провоспалительного цитокина IL-1 β . IL-1 β продуцируется в виде неактивной проформы pro-IL-1, которая затем деградирует с генерацией зрелой формы IL-1 [32]. Созревание IL-1 под влиянием цистеин-протеазы каспазы-1 связано с активацией NALP3-зависимых цитозольных мультибелковые комплексов, получивших название «инфламмосомы». Кроме каспазы-1 инфламмосомы содержат «протеин-сенсор» Nlrp3, который может быть активирован разными стимулами, включая стрептококковый SLO в GAS-стимулированных Мф. Nlrp3 mRNA экспрессируется в Мф конститутивно, а в первые 3 ч после заражения GAS происходит четырехкратное повышение экспрессии гена Nlrp3 [10]. Одновременно пиогенные стрептококки могут продуцировать факторы вирулентности, ингибирующие активацию инфламмосом и созревание IL-1 β . Показано, что стрептококковая NADase снижает инфламмосом-зависимую секрецию IL-1 инфицированными Мф, что представляет один из механизмов избегания стрептококком иммунной защиты [17].

При использовании биоинформационного анализа полного генома *S. pyogenes* идентифицирован новый фактор вирулентности, названный «5-нуклеотидаза А» (S5nA). Внеклеточная S5nA осуществляет конверсию АМР в аденозин, который подавляет иммунный ответ за счет ингибции синтеза макрофагами провоспалительных цитокинов [33].

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ GAS В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ

Способность *S. pyogenes* выживать в жестких условиях микроокружения организма-хозяина определяется наличием у этих бактерий специальных сенсоров, которые призваны регулировать экспрессию факторов вирулентности в постоянно меняющихся условиях развития инфекции. У пиогенного стрептококка адаптивный ответ на сигналы от микроокружения организма-хозяина регулируется сложной сетью глобальных транскрипционных регуляторов. К ним относятся: двухкомпонентный сенсор-регулятор, отдельно стоящие регуляторы ответа и альтернативные сигма-факторы, кодирующие двухкомпонентную регуляторную систему (TCS). У *S. pyogenes* обнаружено 13 разных генов TCSs, из которых изучены более подробно гены регуляторов: CowR/S, FasBCAX, SptR/S и Ink/Irr. Двухкомпонентный глобальный транскрипционный регулятор CowR/S, который контролирует 15% генома *S. pyogenes*, охарактеризован как репрессор транскрипции факторов вирулентности гиалуро-

новой капсулы, цистеин-протеазы SpeB, цитотоксина SLS, стрептокиназы, стрептолизина O и S, цистеин-протеазы Mac/IdeS. В раннюю фазу инфекции наблюдали выраженное стимулирующее действие генов *ink*, *irr*, которые контролируют 20% генома GAS, в том числе синтез пептидогликанов клеточной стенки и факторов, поддерживающих выживание бактерий в Мф. Активация регулятора Ink/Irr при одновременной ингибции негативного транскрипционного регулятора CowR/S ведет к усилению экспрессии нескольких факторов вирулентности: SLS, SIC, ДНКазы, М-протеина, П-8 протеазы, SodA, гиалуроновой капсулы. При этом активируются факторы, блокирующие фагоцитоз и повышающие устойчивость GAS к бактерицидному действию Мф. Мутации генов факторов вирулентности и генов глобальных транскрипционных регуляторов в процессе взаимодействия бактерий с Мф могут приводить к сдвигам бактериального генотипа в направлении усиления инвазивности. Это считают одной из причин перехода бактерионосительства в развитие инвазивной стрептококковой инфекции [5].

С использованием современных методов молекулярной биологии удалось показать, что в ходе развития инфекции и взаимодействия GAS с Мф геном бактерий претерпевает значительные изменения в направлении повышения экспрессии факторов вирулентности [34]. Через 2 ч после инфицирования выявлены изменения генома и протеома *S. pyogenes* по сравнению с внеклеточными бактериями. Во внутриклеточном окружении значительно изменилась экспрессия 145 генов стрептококка, контролирующих метаболические и энергозависимые процессы. В раннюю внутриклеточную фазу происходило повышение экспрессии генов *ink* и *irr*. Экспрессия генов, ответственных за индукцию окислительного взрыва в Мф, в первые 2 ч была снижена. Через 6 ч повышалась экспрессия генов, ответственных за продукцию М-протеина как фактора выживания стрептококков в Мф [35].

Наиболее ярким примером фазовых изменений факторов вирулентности GAS в динамике стрептококковой инфекции и взаимодействия с Мф являются изменения экспрессии цистеин-протеазы SpeB стрептококка. SpeB, наряду с протеолитической деградацией многих белков организма-хозяина, оказалась способна разрушать большинство белков, секретируемых GAS, включая факторы вирулентности: М-протеин, стрептокиназу, SpeF, Sda1, C5a пептидазу, секретируемый ингибитор комплемента. Поэтому повышенная экспрессия SpeB приводит к снижению вирулентности бак-

терий. Разрушая собственный поверхностный М-протеин стрептококка, SpeB повышает чувствительность бактерий к фагоцитозу. В клинико-эпидемиологических исследованиях обнаружена обратная корреляция между тяжестью инфекции M1T1 GAS и экспрессией стрептококковой SpeB. Исследование биоптатов пораженных тканей при инвазивных стрептококковых инфекциях выявило наряду с Мф, содержащими живые стрептококки, повышенное количество SpeB [6]. У инвазивных штаммов GAS экспрессию SpeB регулирует зависимый от фазы роста бактерий фермент эндопептидаза PerO, которая влияет на экспрессию гена *speB* и вирулентность стрептококка [36].

Защитные факторы организма-хозяина оказывают давление на патоген в направлении селекции штаммов, приобретающих новые гены или сохраняющих ключевые факторы вирулентности, необходимые для выживания в определенных нишах организма. В частности, в организме идет преимущественная селекция SpeB-отрицательных бактерий или обеспечивается подавление активности SpeB для поддержания сохранности факторов вирулентности *S. pyogenes*. Ингибция экспрессии SpeB обеспечивает оптимальные условия в нишах организма для персистенции бактерий с сохранением их полного арсенала факторов вирулентности и повышением их патогенного потенциала [37]. Через 60–80 ч после инфицирования стрептококки поселяются в нишах внутренней среды организма (в том числе в макрофагах), которые предназначены для выживания и размножения бактерий и где происходит селекция более подходящих мутантов, лучше защищенных от факторов иммунитета. Наиболее подходящими оказываются мутанты, лишенные экспрессии SpeB [38]. При моделировании инфекции введением штамма SpeB+/SpeA– M1T1 GAS в подкожную камеру мышам обнаружили изменение протеома бактерий: стабильный фазовый сдвиг в сторону фенотипа SpeB–/SpeA+, экспрессирующего и секретирующего полный набор факторов вирулентности. Протеом этого фенотипа SpeB–, приобретенный *in vivo*, не отличался от протеома изогенного мутанта с делецией гена *speB*. Другим примером может служить спонтанная мутация в опероне CowR/S, приводящая к утрате экспрессии SpeB и к усилению транскрипции генов нескольких факторов вирулентности GAS с развитием системной GAS-инфекции [39]. Таким образом, при стрептококковой инфекции осуществляется регуляция экспрессии факторов вирулентности патогена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы широкое использование современных методов молекулярной генетики и протеомики позволило значительно уточнить и конкретизировать наши представления о факторах вирулентности патогенных стрептококков. С помощью биоинформационного анализа полного генома у патогенных штаммов *S. pyogenes* были идентифицированы гены, ответственные, в частности, за способность противодействовать защитным функциям макрофагов: мобилизации в очаг инфекции, захвату бактерий, их внутриклеточной гибели. Названы конкретные гены, контролируемые отдельные механизмы агрессии, значительная часть которых направлена на подавление защитных функций макрофагов. Кроме того, выявлена сложная сеть генов глобальных транскрипционных регуляторов экспрессии многих факторов вирулентности *S. pyogenes*. Показано, что на разных стадиях инфекции и взаимодействия с макрофагами геном *S. pyogenes* претерпевает значительные изменения в направлении повышения экспрессии факторов вирулентности. Экспериментально доказанная способность *S. pyogenes* выживать и пролиферировать внутри клеток организма-хозяина, в том числе в макрофагах, заставляет пересмотреть классическое представление о принадлежности *S. pyogenes* к внеклеточно паразитирующим бактериям. Уточнение природы факторов вирулентности *S. pyogenes* может стать основой поиска средств их нейтрализации в качестве одного из путей лечения инфекции, вызванной инвазивным патогеном. Детальная оценка путей регуляции взаимодействия макрофагов с *S. pyogenes* может быть положена в основу разработки новых лекарственных средств, направленных на активацию механизмов врожденного иммунитета против *S. pyogenes*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Goldmann O., Rohde M., Chhatwal G.S., Medina E. Role of Macrophages in Host Resistance to Group A Streptococci. *Infection and Immunity*. 2004; 72 (5): 2956–2963. DOI: 10.1128/IAI.72.5.2956-2963.2004.
2. Mishalian I., Ordan M., Peled A., Maly A., Eichenbaum M.B., Ravins M., Aychek T., Jung S., Hanski E. Recruited Macrophages Control Dissemination of Group A Streptococcus from Infected Soft Tissues. *The Journal of Immunology*. 2011; 187: 6022–6031. DOI: 10.4049/jimmunol.1101385.
3. Goldmann O., Chhatwal G.S., Medina E. Immune Mechanisms Underlying Host Susceptibility to Infection with Group A Streptococci. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003; 187: 854–861. DOI: 10.1086/368390.
4. Fieber C., Kovarik P. Responses of innate immune cells to group A Streptococcus. *Frontiers in Cellular and In-*

- fection *Microbiology*. 2014; 4 (140): 1–7. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00140.
5. Kwinn L.A., Nizet V. How Group A Streptococcus circumvents host phagocyte defenses. *Future Microbiology*. 2007; 2 (1): 75–84. DOI: 10.2217/17460913.2.1.75.
 6. Pontus T., Johansson L., Low D.E., Gan B.S., Kotb M., McGeer A., Norrby-Teglund A. Viable group a streptococci in macrophages during acute soft tissue infection. *PLoS Medicine*. 2006; 3 (3): 371–379. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030053.
 7. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2009; 73 (3): 407–450. DOI: 10.1128/MMBR.00014-09.
 8. Hamada S., Kawabata S., Nakagawa I. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. *The Proceedings of the Japan Academy, Series B Physical and Biology Science*. 2015; 91 (10): 539–559. DOI: 10.2183/pjab.91.539.
 9. Loof T.G., Goldmann O., Gessner A., Herwald H., Medina E. Aberrant inflammatory response to *Streptococcus pyogenes* in mice lacking myeloid differentiation factor 88. *The American Journal of Pathology*. 2010; 176 (2): 754–763. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090422.
 10. Harder J., Franchi L., Munoz-Planillo R., Park J.-H., Reimer T., Nunez G. Activation of the nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF- κ B Activation but Proceeds Independently of TLR signaling and P2X7 Receptor. *The Journal of Immunology*. 2009; 183: 5823–5829. DOI: 10.4049/jimmunol.0900444.
 11. Schommer N.N., Muto J., Nizet V., Gallo R.L. Hyaluronan Breakdown Contributes to Immune Defense against Group A Streptococcus. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289 (39): 26914–26921. DOI: 10.1074/jbc.M114.575621.
 12. Суворова М.А., Крамская Т.А., Суворов А.Н., Киселева Е.П. Инактивация гена белка М111 влияет на взаимодействие *Streptococcus pyogenes* с макрофагами мышей *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 164 (9): 330–334. [Suvorova M.A., Kramskaya T.A., Suvorov A.N., Kiseleva E.P. Inactivation of M111 protein gene affects the interaction of *Streptococcus pyogenes* with mice macrophages *in vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 164 (9): 330–334 (in Russ.)].
 13. Von Pawel-Rammingen U. Streptococcal IdeS and its impact on immune response and inflammation. *Journal of Innate Immunity*. 2012; 4: 132–140. DOI: 10.1159/000332940.
 14. O'Neill A.M., Thurston T.L.M., Holden D.W. Cytosolic replication of group a streptococcus in human macrophages. *Molecular Biology*. 2016; 7 (2): 1–16. DOI: 10.1128/mBio.00020-16.
 15. Herten E., Johansson L., Wallin R., Schmidt H., Kroll M., Rehn A.P., Kotb M., Morgelin M., Norrby-Teglund A. M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *Journal of Innate Immunity*. 2010; 2: 534–545. DOI: 10.1159/000317635.
 16. Barnett T.C., Liebl D., Seymour L.M., Gillen C.M., Lim J.Y., LaRock C.N., Davies M.R., Schulz B.L., Nizet V., Teasdale R.D., Walker M.J. The globally disseminated m1t1 clone of group a *Streptococcus* evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host & Microbe*. 2013; 14: 675–682. DOI: 10.1016/j.chom.2013.11.003.
 17. Hancz D., Westerlund E., Bastiat-Sempe B., Sharma O., Valfridsson C., Meyer L., Love J.F., O'Seaghda M., Wessels M.R., Persson J.J. Inhibition of inflammasome-dependent interleukin 1 β production by streptococcal NAD⁺-Glycohydrolase: evidence for extracellular activity. *Molecular Biology*. 2017; 8 (4): e00756–007517. DOI: 10.1128/mBio.00756-17.
 18. Bastiat-Sempe B., Love J.F., Lomayeva N., Wessels M.R. Streptolysin O and NAD-glycohydrolase prevent phagolysosome acidification and promote group a *Streptococcus Survival* in macrophages. *Molecular Biology*. 2014; 5 (5): 1690–1714. DOI: 10.1128/mBio.01690-14.
 19. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998: 1–72.
 20. Cusumano Z.T., Caparon M.G. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase. *J. Bacteriol*. 2015; 197 (7): 1288–1296. DOI: 10.1128/JB.02517-14.
 21. Casiano-Colyn A., Marquis R.E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ Microbiol*. 1988; 54 (6): 1318–1324.
 22. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochemistry and Cell Biology*. 2016; 94 (2): 129–137. DOI: 10.1139/bcb-2015-0069.
 23. Degnan B.A., Fontaine M.C., Doebereiner A.H., Lee J.J., Mastroeni P., Dougan G., Goodacre J.A., Kehoe M.A. Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect Immun*. 2000; 68 (5): 2441–8. DOI: 10.1128/IAI.68.5.2441-2448.2000.
 24. Winterhoff N., Goethe R., Gruening P., Rohde M., Kalisz H., Smith H.E., Valentin-Weigand P. Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the arginine deiminase system of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol*. 2002; 184 (24): 6768–6776. DOI: 10.1128/JB.184.24.6768-6776.2002.
 25. Xiong L., Teng J.L.L., Botelho M.G., Lo R.C., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Arginine metabolism in bacterial pathogenesis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17: 363. DOI: 10.3390/ijms17030363.
 26. Ryan S., Begley M., Gahan C.G., Hill C. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ. Microbiol*. 2009; 11: 432–445. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01782.x.

27. Lee E.J., Pontes M.H., Groisman E.A. A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase. *Cell*. 2013; 154: 146–156. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.004.
28. Wu G., Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998; 336: 1–17.
29. Fang F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 820–832. DOI: 10.1038/nrmicro1004.
30. Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А., Головин А.С., Лебедева А.М., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеминазы пиогенного стрептококка в подавлении синтеза монооксида азота (NO) макрофагами. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8 (2): 211–218. [Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., Golovin A.S., Lebedeva A.M., Vasil'ev V.B., Frejdlin I.S. The role of arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* in inhibiting the synthesis of nitrogen monoxide (NO) by macrophages. *Infection and Immunity*. 2018; 8 (2): 211–218 (in Russ.)]. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-2-211-218.
31. Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I. Lactobacilli and streptococci induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and Gamma Interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*. 1998; 66 (12): 6058–6062.
32. Latvala S., Mäkelä S.M., Miettinen M., Charpentier E., Julkunen I. Dynamis inhibition interferes with inflammatory activation and cytokine gene expression in *Streptococcus pyogenes*-infected human macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*. 2014; 178: 320–333. DOI: 10.1111/cei.12425.
33. Zheng L., Khemlani A., Lorenz N., Loh J.M.S., Langley R.J., Proft T. Streptococcal 5'-nucleotidase A (S5nA), a novel *Streptococcus pyogenes* virulence factor that facilitates immune evasion. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290 (52): 31126–31137. DOI: 10.1074/jbc.M115.677443.
34. Kwinn L.A., Khosravi A., Aziz R.K., Timmer A.M., Doran K.S., Kotb M., Nizet V. Genetic characterization and virulence role of the RALP3/LSA locus upstream of the Streptolysin S operon in invasive MIT1 group A *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology*. 2007; 189 (4): 1322–1329. DOI: 10.1128/JB.01256-06.
35. Herten E., Johansson L., Kansal R., Hecht A., Dahesh S., Janos M., Nizet V., Kotb M., Norrby-Teglund A. Intracellular *Streptococcus pyogenes* in human macrophages display an altered gene expression profile. *PLoS One*. 2012; 7 (4): 1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0035218.
36. Brouwer S., Cork A.J., Ong C.Y., Barnett T.C., West N.P., McIver K.S., Walker M.J. Endopeptidase PepO regulates the SpeB cysteine protease and is essential for the virulence of Invasive MIT1 *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology*. 2018; 200 (8): e00654–006517. DOI: 10.1128/JB.00654-17.
37. Krishnan K.C., Mukundan S., Landero Figueroa J.A., Caruso J.A., Kotb M. Metal-mediated modulation of streptococcal cysteine protease activity and its biological implications. *Infection and Immunity*. 2014; 82 (7): 2992–3001. DOI: 10.1128/IAI.01770-14.
38. Aziz R.K., Kotb M. Rise and Persistence of Global MIT1 Clone of *Streptococcus pyogenes*. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14 (10): 1511–1517. DOI: 10.3201/eid1410.071660.
39. Aziz R.K., Pabst M.J., Jeng A., Kansal R., Low D.E., Nizet V., Kotb M. Invasive MIT1 group A *Streptococcus* undergoes a phase-shift in vivo to prevent proteolytic degradation of multiple virulence factors by SpeB. *Molecular Microbiology*. 2004; 51 (1): 123–134. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03797.x.

Сведения об авторах

Фрейдлин Ирина Соломоновна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, гл. науч. сотрудник, отдел иммунологии, Институт экспериментальной медицины; кафедра иммунологии, ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург. ORCID iD 0000-0001-6637-3481.

Старикова Элеонора Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, отдел иммунологии, Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург. ORCID iD 0000-0002-9687-7434.

Лебедева Александра Михайловна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, отдел иммунологии, Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург. ORCID iD 0000-0002-4951-8447.

✉ Фрейдлин Ирина Соломоновна, e-mail: irinaf-n@yandex.ru.

Поступила в редакцию 09.06.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Author information

Freydlin Irina S., DM, Professor, Corresponding Member RAS, Main Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6637-3481.

Starikova Eleonora A., PhD, Senior Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation. Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9687-7434.

Lebedeva Aleksandra M., PhD, Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4951-8447.

✉ Freydlin Irina S., e-mail: irinaf-n@yandex.ru.

Received 09.06.2018
Accepted 17.12.2018