

Сальмонелла-индуцированные изменения кишечной микробиоты и транскриптома генов иммунного ответа на фоне введения ванкомицина и *Bacteroides fragilis*

Ю. В. Букина, А. М. Камышный, Н. Н. Полищук, И. А. Топол

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Ключевые слова:

микробиом, сальмонелла, ванкомицин, бактериоиды, экспрессия, ПЦР-РВ.

Цель работы – изучить сальмонелла-индуцированные изменения пристеночной кишечной микробиоты, экспрессии эффекторных белков сальмонелл *SipA*, *SopB*, *SopE2* и транскрипционной активности генов *FFAR2*, *Foxp3*, *RORγt* в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) крыс на фоне введения ванкомицина и *B. fragilis*.

Материалы и методы. Проведены исследования количественного и качественного состава пристеночной микробиоты тонкого кишечника и определён уровень экспрессии генов крыс *Foxp3*, *Rorc* (*Royt*), *FFAR2* и эффекторных белков сальмонелл *SipA*, *SopB* и *SopE2* методом ПЦР-РВ, установлены взаимосвязи между группами микроорганизмов.

Результаты. Введение *B. fragilis* на фоне предобработки ванкомицином и инфицирование сальмонеллами изменяет количественный состав микробиоты в пристеночном содержимом тонкого кишечника: наблюдается уменьшение *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. и *Shigella* spp., а также увеличение *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium* и *Peptostreptococcus anaerobius*. Уровень экспрессии эффекторных белков сальмонелл у животных при сочетанном введении ванкомицина и *S. enteritidis* (I группа), *S. typhimurium* (II группа) увеличился: *SopB* – в 101 и 20 раз; *SopE2* – в 80 и 2 раза; *SipA* – в 613 раз (II группа), также отмечалось уменьшение в 5 раз в I группе. Относительное нормализованное количество мРНК генов *FFAR2*, *Foxp3*, *RORγt* в КАЛТ крыс в III и IV группах увеличивалось: *FFAR2* – в 2,7 и 5,4 раза; *Foxp3* – в 2,5 и 85 раз, уровень *RORγt* снизился на 70 % и только в IV группе.

Выводы. Использование *B. fragilis* создаёт условия для коррекции сальмонелла-индуцированных изменений кишечного микробиома. Предобработка животных ванкомицином вызывает усиление транскрипционной активности генов *SipA*, *SopB* и *SopE2*, за исключением *SipA* после введений *S. enteritidis*. Введение *B. fragilis* повышает уровень мРНК генов *FFAR2* и *Foxp3* в КАЛТ, а также снижает *RORγt* после инфицирования *S. typhimurium*.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 1(39). – С. 12–19

DOI: 10.14739/2310-1237.2017.1.97504

E-mail: lingvus@mail.ru

Ключові слова:

мікробіом, сальмонела, ванкоміцин, бактериоїди, експресія, ПЛР-РВ.

Сальмонела-індуковані зміни кишкової мікробіоти та транскриптома генів імунної відповіді на тлі введення ванкоміцину й *Bacteroides fragilis*

Ю. В. Букіна, О. М. Камішний, Н. М. Поліщук, І. О. Топол

Мета роботи – вивчити сальмонела-індуковані зміни пристінкової кишкової мікробіоти, експресії ефекторних білків сальмонел *SipA*, *SopB*, *SopE2* й транскрипційної активності генів *FFAR2*, *Foxp3*, *RORγt* у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині (КАЛТ) щурів на тлі введення ванкоміцину та *B. fragilis*.

Матеріали та методи. Здійснили дослідження кількісного та якісного складу пристінкової мікробіоти тонкого кишечника й визначили рівень експресії генів щурів *Foxp3*, *RORC* (*Royt*), *FFAR2* та ефекторних білків сальмонел *SipA*, *SopB* і *SopE2* методом ПЛР-РЧ, встановили взаємозв'язки між групами мікроорганізмів.

Результати. Введення *B. fragilis* на тлі передобробки ванкоміцином та інфікування сальмонелами змінює кількісний склад мікробіоти у пристінковому вмісті тонкого кишечника. Спостерігається зменшення *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. і *Shigella* spp., а також збільшення *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium* і *Peptostreptococcus anaerobius*. Рівень експресії ефекторних білків сальмонел у тварин при одночасному введенні ванкоміцину та *S. enteritidis* (I група), *S. typhimurium* (II група) збільшився: *SopB* – у 101 і 20 разів; *SopE2* – у 80 і 2 рази; *SipA* – у 613 разів (II група), а також відзначалось зменшення в 5 разів у I групі. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *FFAR2*, *Foxp3*, *RORγt* у КАЛТ щурів у III і IV групах збільшувалася: *FFAR2* – у 2,7 і 5,4 раза; *Foxp3* – у 2,5 і 85 разів, рівень *RORγt* знизився на 70 % і тільки в IV групі.

Висновки. Використання *B. fragilis* створює умови для корекції сальмонела-індукованих змін кишкового микробиома. Передобробка тварин ванкоміцином викликає посилення транскрипційної активності генів *SipA*, *SopB* і *SopE2*, за винятком *SipA* після введення *S. enteritidis*. Уведення *B. fragilis* підвищує рівень мРНК генів *FFAR2* та *Foxp3* в КАЛТ, а також знижує *RORγt* після інфікування *S. typhimurium*.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 1(39). – С. 12–19

Key words:

microbiome, Salmonella, vancomycin, Bacteroides, Real-Time PCR.

Salmonella-induced changes in the gut microbiota and immune response genes transcriptome during administration of vancomycin and *Bacteroides fragilis*

Yu. V. Bukina, A. M. Kamyshnyi, N. N. Polishchuk, I. A. Topol

The aim. To study Salmonella-induced changes in the intestinal wall microbiota, the expression of *Salmonella* effector proteins *SipA*, *SopB*, *SopE2* and transcriptional activity of genes *FFAR2*, *Foxp3*, *RORγt* in rat GALT during administration of vancomycin and *B. fragilis*.

Methods. Investigations of qualitative and quantitative composition of the microbiota of the wall of the small intestine were carried out, and the expression level of rat genes *Foxp3*, *Rorc* (*Royt*), *FFAR2* and *Salmonella* effector proteins *SipA*, *SopB* and *SopE2* were determined by RT-PCR, the relationship between groups of microorganisms was established.

Results. Administration of *B. fragilis* against the background pre-treatment with vancomycin and *Salmonella* infection alters the quantitative composition of the microbiota in the wall of the small intestine contents: a decrease in *Salmonella* spp., *E. coli*, *Paeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. and *Shigella* spp., as well as increasing *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium* and *Peptostreptococcus anaerobius*. The level of expression of *Salmonella* effector proteins in animals with the combined administration of vancomycin and *S. enteritidis* (I group), *S. typhimurium* (II group) increased: *SopB* – 101 and 20 times; *SopE2* – 80 and 2 times; *SipA* – 613 times (II group), and also 5-fold decrease was noted in the I group. Relative normalized number of mRNA of genes *FFAR2*, *Foxp3*, *RORyt* in GALT of rats in groups III and IV increased: *FFAR2* – 2.7 and 5.4 times; *Foxp3* – 2.5 and 85 times, *RORyt* level decreased by 70% and only in IV group.

Conclusions. Using *B. fragilis* creates conditions for the correction of *Salmonella*-induced changes of the intestinal microbiome. Pretreatment of animals with vancomycin causes increased transcriptional activity of genes *SipA*, *SopB* and *SopE2*, except *SipA* after administration of *S. enteritidis*. Administration of *B. fragilis* increases the level of mRNA of genes *FFAR2* and *Foxp3* in GALT and reduces *RORyt* after infection with *S. typhimurium*.

Молекулярные механизмы взаимодействия сальмонелл с клетками организма хозяина имеют важный практический интерес. При попадании патогенных микроорганизмов в кишечник происходит их тесное взаимодействие с представителями аутохтонной микрофлоры, что определяет характер активации врождённых и адаптивных звеньев кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) и влияет на исход инфекционного заболевания [1,2]. Наши предыдущие исследования показали, что, несмотря на наличие генов резистентности *Van A* у 11,46% и *Van B* у 6,25%, у фенотипически резистентных штаммов микроорганизмов семейства *Enterococcaceae* [3] при отдельном введении крысам ванкомицина и сальмонелл наблюдается изменение состава кишечного микробиома, что свидетельствует о конкурентов представителей нормальной и патогенной микрофлоры за микробиоматерию кишечника [4]. Дальнейшие работы продемонстрировали, что при инфицировании крыс *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium* на фоне предварительного введения ванкомицина отмечается резкое увеличение содержания сальмонелл и значительное уменьшение аутохтонных микроорганизмов.

Мы предполагаем, что ванкомицин-индуцированное усиление инвазии сальмонелл в КАЛТ может быть вызвано изменением экспрессии их эффекторных белков – *SipA*, *SopB* и *SopE2*, вызывающих деформацию цитоплазматической мембраны, перестройку цитоскелета, способствующим быстрому проникновению патогена в SCV (*Salmonella*-containing vacuole) энтероцитов [5,6]. Инвазия сальмонелл и дисбаланс комменсальной микрофлоры сопровождаются увеличением лигандов для Toll- и NOD-подобных рецепторов (TLR, NLR) врождённого иммунитета, активацией Nlrp3-инфламмосомы, а также усилением экспрессии генов провоспалительных цитокинов и молекул активации адгезии, T- и B-лимфоцитов, что клинически проявляется развитием энтероколитов [7].

В то же время функциональный состав КАЛТ и дифференцировка субпопуляций T-клеток зависит от состава отдельных представителей кишечной микрофлоры. Так, сегментарные нитевидные бактерии (*Segmented filamentous bacteria*, SFB) индуцируют в КАЛТ дифференцировку провоспалительных Th17-клеток, а некоторые представители рода *Clostridium* (cluster IV и XIVa) и *Bacteroides fragilis* (полисахарид А (PSA)), стимулируют

образование T-регуляторных клеток (Treg) и продукцию супрессорного цитокина ИЛ-10 [8]. Важными метаболитами *B. fragilis* являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), выполняющие роль связующего звена между микрофлорой и иммунной системой, которые активируют клетки КАЛТ через рецептор *FFAR2* [9]. Уменьшение концентрации таких КЦЖК, как бутират, пропионат и ацетат, снижает численность Treg в кишечнике и нарушает баланс Th17/Treg, а также изменяет уровень мРНК *FFAR2*, что приводит к развитию воспалительных заболеваний кишечника [10].

Цель работы

Изучить сальмонелла-индуцированные изменения пристеночной кишечной микробиоты, экспрессии эффекторных белков сальмонелл *SipA*, *SopB*, *SopE2* и транскрипционной активности генов *FFAR2*, *Foxp3*, *RORyt* в КАЛТ крыс на фоне введения ванкомицина и *B. fragilis*.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 40 самцах крыс линии Вистар 3-месячного возраста, которые были разделены на 4 группы (по 10 в каждой): I – *Vancomycin* + *S. enteritidis* (животные, получившие при пероральном введении ванкомицин в дозе 50 мг/кг и через сутки получившие бактериальную нагрузку *S. enteritidis* в количестве 3×10^8 КОЕ/мл); II – *Vancomycin* + *S. typhimurium* (животные, получившие при введении *per os* ванкомицин в дозе 50 мг/кг и через сутки получившие бактериальную нагрузку *S. typhimurium* в количестве 3×10^8 КОЕ/мл); III – *Vancomycin* + *S. enteritidis* + *B. fragilis* (животные, получившие при пероральном введении ванкомицин в дозе 50 мг/кг, через сутки – бактериальную нагрузку *S. enteritidis* в количестве 3×10^8 КОЕ/мл и на следующий день получивших *B. fragilis* в количестве 3×10^8 КОЕ/мл); IV – *Vancomycin* + *S. typhimurium* + *B. fragilis* (животные, получившие при пероральном введении ванкомицин в дозе 50 мг/кг, через сутки – бактериальную нагрузку *S. typhimurium* в количестве 3×10^8 КОЕ/мл и на следующий день – *B. fragilis* в количестве 3×10^8 КОЕ/мл). На пятые сутки крыс выводили из эксперимента с соблюдением принципов эвтаназии.

Заражение животных проводили суточными культурами сальмонелл, выращенных на 1,5% МПА, которые

получены из музея штаммов микроорганизмов «Украинского центра по контролю и мониторингу заболеваний» МОЗ Украины. Культуры бактериоидов выращивали на питательных средах, приготовленных согласно методическим рекомендациям «Лабораторная диагностика гнойно-воспалительных заболеваний, обусловленных аспорогенными анаэробными микроорганизмами» (Харьков, 2000). Бактериальные суспензии стандартизировали при помощи денситометра DEN-1B (Biosan) по МакФарланду (McF). Для введения крысам *S. enteritidis*, *S. typhimurium* и *B. fragilis* нами были приготовлены суспензии в концентрации 1,0 стандарта McF, что соответствует концентрации 3×10^8 КОЕ/мл. В качестве материала для ПЦР-РВ исследований микробиома использовали пристеночное содержимое подвздошной кишки крысы.

Выделение ДНК проводили набором реагентов «ДНК-ЭКСПРЕСС» («Литех», Российская Федерация). Для количественного определения специфических участков бактериальной ДНК методом ПЦР-РВ применяли наборы реактивов формата «ФЛУОРОПОЛ-РВ» и «СЕПТОСКРИН-РВ» комплекта «Нераскапанный»: колипол (обнаружение *E. coli*), аругипол (*P. aeruginosa*), бактопол (*Bacteroides fragilis, vulgatus, thetaiotaomicron, ovatus*), энкопол (*E. faecali* и *E. faecium*), протепол (*Proteus spp.*), энтеропол (*Enterobacter spp.* и *Klebsiella spp.*), пептострептококки (*Peptostreptococcus anaerobius*), сальмонеллы (*Salmonella spp.*), шигеллы (*Shigella spp.*). Все исследования выполнялись в соответствии с инструкциями изготовителя («Литех», Российская Федерация). Результаты амплификации анализировались с помощью программы Bio-Rad CFX Manager 3.0.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel 2016 и StatSoft Statistica v12. При анализе распределений количественных данных определяли меры центральной тенденции – медиана (Me), и меры дисперсии – интерквартильный размах в виде 25 и 75 перцентилей. Для расчёта достоверности различий между средними

значениями использовали непараметрический критерий Mann–Whitney (U-test). Определение степени взаимосвязи между парами независимых признаков, выраженных в количественной шкале, осуществляли при помощи коэффициента ранговой корреляции Spearman (R). Статистически значимыми считали отличия при значении $p \leq 0,05$.

Молекулярно-генетические исследования проводились методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ПЦР-ОТ). РНК выделяли из сгруппированных лимфоидных узелков (Пейеровых бляшек) подвздошной кишки крысы. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» («Изоген», Российская Федерация), который содержит Trizol reagent и ExtraGene. Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ-1)» («СИНТОЛ», Российская Федерация). Реакционная смесь общим объёмом 25 мкл содержала: 2 мкл тотальной РНК, 1 мкл Random-6 праймера, 8,5 мкл деионизированной H_2O , очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °С на протяжении 45 минут с последующим нагреванием, для инактивирования MMLV-RT – на протяжении 5 минут при 92 °С.

Для определения уровня экспрессии исследуемых генов крыс *Foxp3*, *Rorc* (*Royt*), *FFAR2* и эффекторных белков сальмонелл *SipA*, *SopB* и *SopE2* использовали набор реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) и амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США). Финальная реакционная смесь для амплификации содержала краситель SYBR Green, ДНК – полимеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили к общему объёму 25 мкл добавлением деионизированной H_2O . Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референсного генов были подобраны при помощи программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмами Metabion (ФРГ) и ThermoScientific (США) (табл. 1, 2).

После начальной денатурации на протяжении 10 мин при 95 °С амплификация состояла из 45 циклов и проводилась при условиях: денатурация – 95 °С, 15 с, отжиг – 59–61 °С, 30–60 с, элонгация – 72 °С, 30 с. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов крыс использован ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GAPDH). В качестве референс-гена сальмонелл использовали ген энлазы STY3081 [11, 12]. Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли сравнительным методом $\Delta\Delta Ct$. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В эксперимент включали отрицательные контроли без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фрагмента в синтезе кДНК. Все реакции амплификации выполняли на индивидуальных образцах в трёх повторах.

Таблица 1. Праймеры для определения уровня экспрессии генов *FFAR2*, *Foxp3* и *Rorc* (*Royt*) крысы

| Ген | Праймер |
|-----------------------------|---|
| <i>FFAR2</i> | F = GGTCTCTTTTCGTCCTCCCA R = GCATGATCCATACAAGCGCC |
| <i>Foxp3</i> | F = CGAGACTTGGAAAGTCAGCCAC R = TCTGAGGCAGGCTGGATAACG |
| <i>Rorc</i> (<i>Royt</i>) | F = AACATCTCGGGAGTTGCTGG R = TCGATTTGTGAGGTGTGGGT |
| <i>GAPDH</i> | F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCAACACCTTCT |

Таблица 2. Праймеры к эффекторным белкам сальмонелл

| Ген | Праймер |
|----------------------------------|---|
| <i>sipA</i> | F = TGTTTCGGCTATTATCAATCGTCT R = CGCAGCAATCTTACGCACCT |
| <i>sopB</i> | F = TGAGTAACCCGACGGATACCAGT R = AGCATCAGAAGGCGTCTAACCCAC |
| <i>sopE2</i> | F = CGGCGTAACCTCTTTCATAACGA R = AGGGTAGGGCGGTATTAACCCAGT |
| <i>Enolase</i> <i>STY3081</i> | F = GCTCCGTCAGGTGCTTCTAC R = GCGTCTTTGCCAAGAATAGC |

Результаты и их обсуждение

Полученные в ходе исследований результаты анализа количественного и видового состава пристеночной микрофлоры говорят о том, что при введении экспериментальным животным *B. fragilis* наблюдаются выраженные изменения (табл. 3). Так, в группах III и IV отмечается значительное уменьшение уровня *E. coli* и *P. aeruginosa* ($p \leq 0,05$), а количество представителей *Bacteroides spp.* достоверно увеличивается ($p \leq 0,05$) (табл. 3).

Уровень содержания *E. faecalis* и *E. faecium* увеличился в 17 раз только в третьей группе ($p \leq 0,05$), а количество *Proteus spp.* уменьшается в III группе в 77 раз ($p \leq 0,05$), но увеличивается в IV в 4 раза ($p \leq 0,05$). Также в III и IV группах отмечается резкое снижение содержания представителей *Enterobacter spp.* и *Klebsiella spp.* ($p \leq 0,05$). Количественный состав *Peptostreptococcus anaerobius* достоверно увеличился в 9 раз ($p \leq 0,05$) и только в четвертой группе. Показательно, что в III и IV группах отмечается интенсив-

ное уменьшение уровня *Salmonella spp.* на фоне менее выраженного снижения количества *Shigella spp.* (табл. 3). Оценка степени взаимосвязи между группами микроорганизмов при помощи коэффициента ранговой корреляции Spearman (R) показала, что в III и IV группах наблюдается прямая умеренная зависимость между числом *E. coli* и *Peptostreptococcus anaerobius* ($R = 0,73$ и $R = 0,69$), а также сильная прямая зависимость в IV группе между *Proteus spp.* и *Salmonella spp.* ($R = 0,9$). Умеренная обратная связь наблюдается в третьей группе между представителями *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* и *Peptostreptococcus anaerobius* ($R = -0,68$), *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* и *Salmonella spp.* ($R = -0,66$), а также в четвертой группе между *Bacteroides spp.* и *Peptostreptococcus anaerobius* ($R = -0,73$). Данные корреляционного анализа свидетельствуют о том, что введение бактериоидов оказывает существенное влияние на состояние между отдельными группами микроорганизмов, приводя к подавлению роста *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* и *Salmonella spp.*

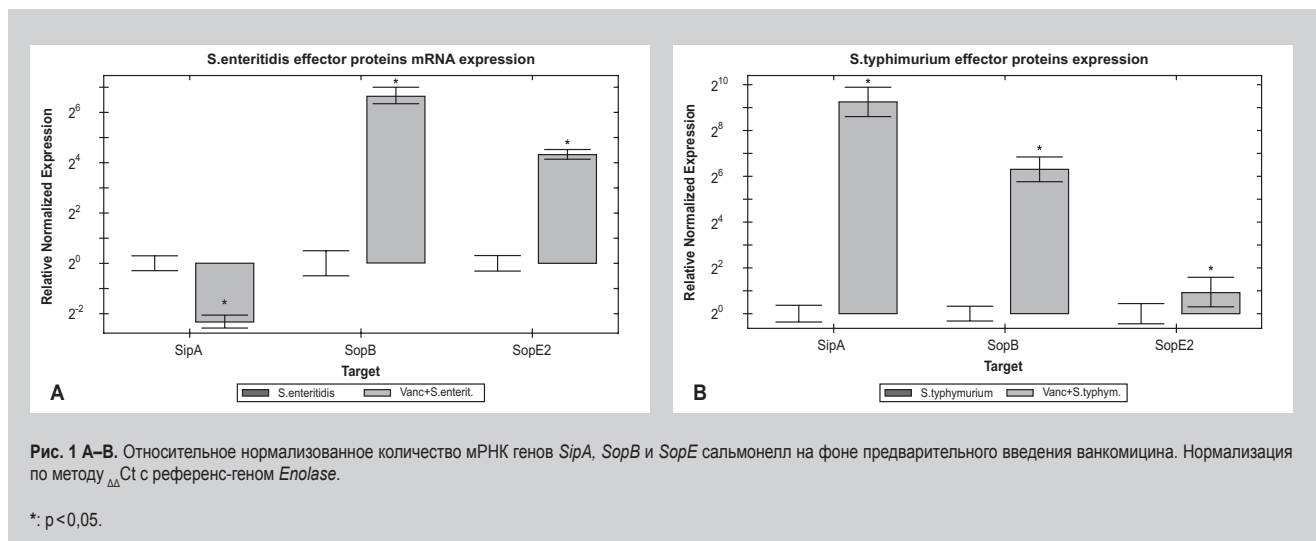


Таблица 3. Количественный состав пристеночной микрофлоры подвздошной кишки экспериментальных крыс (ГЭ/обр.)

| Группы микроорганизмов | Группы экспериментальных животных | | | |
|---|---|---|--|--|
| | <i>Vancomycin</i> + <i>S. enteritidis</i> (n=10) | <i>Vancomycin</i> + <i>S. typhimurium</i> (n=10) | <i>Vancomycin</i> + <i>S. enteritidis</i> + <i>B. fragilis</i> (n=10) | <i>Vancomycin</i> + <i>S. typhimurium</i> + <i>B. fragilis</i> (n=10) |
| | Количество микроорганизмов (Ме (Q25–Q75)) (ГЭ/обр.) | | | |
| <i>E. coli</i> | 7,91 × 10 ⁶ (6,53 × 10 ⁶ –8,88 × 10 ⁶) | 3,67 × 10 ⁵ (3,30 × 10 ⁵ –4,56 × 10 ⁵) | 3,16 × 10 ² (2,33 × 10 ² –3,84 × 10 ²) [*] | 4,64 × 10 ² (3,97 × 10 ² –4,96 × 10 ²) [*] |
| <i>P. aeruginosa</i> | 2,28 × 10 ⁶ (3,13 × 10 ⁵ –3,16 × 10 ⁶) | 1,72 × 10 ⁶ (1,51 × 10 ⁶ –1,88 × 10 ⁶) | 2,22 × 10 ² (1,84 × 10 ² –2,26 × 10 ²) [*] | 6,84 × 10 ² (4,33 × 10 ² –7,93 × 10 ²) [*] |
| <i>Bacteroides spp.</i> | 1,96 × 10 ² (1,47 × 10 ² –2,23 × 10 ²) | 2,79 × 10 ² (2,21 × 10 ² –4,54 × 10 ²) | 9,2 × 10 ⁵ (8,86 × 10 ⁵ –9,43 × 10 ⁵) [*] | 6,76 × 10 ⁶ (6,03 × 10 ⁶ –9,02 × 10 ⁶) [*] |
| <i>E. faecalis</i> и <i>E. faecium</i> | 3,15 × 10 ¹ (3,04 × 10 ¹ –3,41 × 10 ¹) | 1,62 × 10 ² (7,43 × 10 ¹ –5,43 × 10 ²) | 5,27 × 10 ² (4,46 × 10 ² –5,99 × 10 ²) [*] | 5,01 × 10 ² (4,07 × 10 ² –6,18 × 10 ²) |
| <i>Proteus spp.</i> | 7,62 × 10 ³ (6,43 × 10 ³ –5,03 × 10 ⁴) | 3,41 × 10 ¹ (3,15 × 10 ¹ –4,2 × 10 ¹) | 9,88 × 10 ¹ (5,05 × 10 ¹ –21,3 × 10 ¹) [*] | 1,47 × 10 ² (1,28 × 10 ² –2,18 × 10 ²) [*] |
| <i>Enterobacter spp.</i> и <i>Klebsiella spp.</i> | 1,25 × 10 ⁶ (9,94 × 10 ⁵ –1,98 × 10 ⁶) | 7,07 × 10 ⁶ (3,98 × 10 ⁶ –8,18 × 10 ⁶) | 4,86 × 10 ² (2,38 × 10 ² –7,18 × 10 ²) [*] | 4,23 × 10 ² (3,98 × 10 ² –4,43 × 10 ²) [*] |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | 2,38 × 10 ¹ (2,2 × 10 ¹ –2,47 × 10 ¹) | 3,14 × 10 ¹ (2,89 × 10 ¹ –5,15 × 10 ¹) | 2,0 × 10 ¹ (1,44 × 10 ¹ –2,21 × 10 ¹) | 2,85 × 10 ² (2,53 × 10 ² –3,16 × 10 ²) [*] |
| <i>Salmonella spp.</i> | 2,65 × 10 ⁷ (2,44 × 10 ⁷ –2,81 × 10 ⁷) | 5,64 × 10 ⁷ (4,32 × 10 ⁷ –7,65 × 10 ⁷) | 7,06 × 10 ¹ (6,62 × 10 ¹ –7,89 × 10 ¹) [*] | 2,49 × 10 ² (2,41 × 10 ² –3,17 × 10 ²) [*] |
| <i>Shigella spp.</i> | 1,75 × 10 ³ (1,47 × 10 ³ –3,07 × 10 ³) | 5,09 × 10 ³ (2,6 × 10 ³ –7,83 × 10 ³) | 4,0 × 10 ² (2,55 × 10 ² –5,31 × 10 ²) [*] | 2,46 × 10 ² (1,75 × 10 ² –3,11 × 10 ²) [*] |

*: достоверность отличий параметров $p \leq 0,05$ по отношению к группам *Vancomycin* + *S. enteritidis* и *Vancomycin* + *S. typhimurium*.

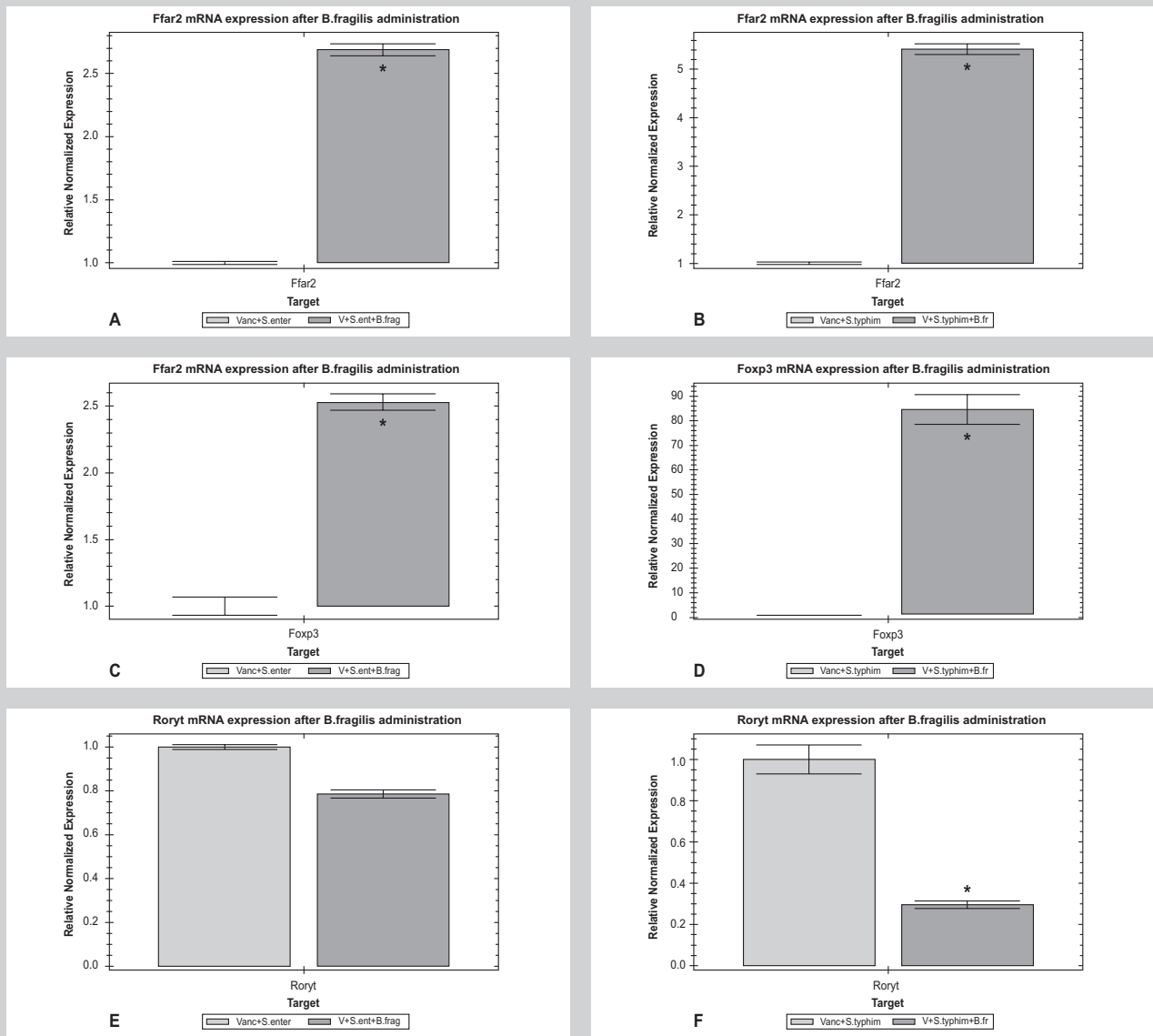


Рис. 2. Относительное нормализованное количество мРНК генов *FFAR2* (A–B), *Foxp3* (C–D) и *RORyt* (E–F) в сгруппированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс после введения *B. fragilis*. Нормализация по методу $\Delta\Delta$ с референс-геном *GAPDH*.

*: $p < 0,05$.

В ходе исследований нами были определены уровни экспрессии генов эффекторных белков *SipA*, *SopB* и *SopE2* *S. enteritidis* и *S. typhimurium* на фоне предварительного введения ванкомицина. Выяснилось, что предобработка животных ванкомицином вызывает усиление транскрипционной активности генов *SipA*, *SopB* и *SopE2*, за исключением *SipA* после введения *S. enteritidis*. Так, в группе *Vancomycin* + *S. enteritidis* уровень экспрессии гена *SipA* уменьшился в 5 раз ($p \leq 0,05$), а *SopB* и *SopE2* увеличился в 101 и 20 раз ($p \leq 0,05$) соответственно (рис. 1A). В группе *Vancomycin* + *S. typhimurium* наблюдалось увеличения уровня мРНК генов *SipA*, *SopB* и *SopE2* в 613, 80 и 2 раза соответственно ($p \leq 0,05$) (рис. 1B).

Учитывая, что *B. fragilis* являются одними из основных продуцентов КЦЖК, которые активируют клетки КАЛТ через рецептор *FFAR2*, мы также определили

уровень экспрессии мРНК гена, кодирующего рецепторы короткоцепочечных свободных жирных кислот *FFAR2*. Оказалось, что относительное нормализованное количество мРНК гена *FFAR2* в группах *Vancomycin* + *S. enteritidis* и *Vancomycin* + *S. typhimurium* + *B. fragilis* увеличилось в 2,7 и 5,4 раза соответственно ($p \leq 0,05$) (рис. 2 A–B). Данные изменения сопровождались увеличением уровня мРНК транскрипционного фактора *Foxp3*, направляющего дифференцировку Т-клеток в сторону Treg.

Так, транскрипционная активность гена *Foxp3* увеличилась в III и IV группах в 2,5 и 85 раз соответственно ($p \leq 0,05$) (рис. 2 C–D). Уровень экспрессии транскрипционного фактора *RORyt*, регулирующего дифференцировку субпопуляции Th17-клеток, не изменялся в третьей и достоверно снижался в четвертой группе (на 70%, $p \leq 0,05$) (рис. 2 E–F).

Особый интерес представляет изучение молекулярных механизмов, которые используют сальмонеллы для изменения физиологии клеток хозяина, прежде всего, посредством продукции эффекторных белков, вызывающих внедрение, выживание и ауторепродукцию бактерий в пределах тканей организма, что приводит к воспалению кишечника. Колонизация тканей хозяина сальмонеллами зависит от синтеза ими целого ряда факторов, гены которых расположены в кластерах патогенности сальмонелл (Salmonella Pathogenicity Islands, SPI) [12]. SPI 1 и SPI 2 кодируют систему секреции 3-го типа (Т3SS-1), своего рода “молекулярный шприц”, обеспечивающий перенос более 20 эффекторных белков из бактериальной клетки в цитоплазму клетки хозяина [13]. Транслокация белков *SipA*, *SopB* и *SopE2* является критической для эффективной инвазии сальмонелл в КАЛТ не только через М-клетки фолликуло-ассоциированного эпителия, а и через обычные энтероциты. При этом инозитолфосфатазная активность белка *SopB* за счёт активации ГТФазы RhoG влияет на реорганизацию актина. *SipA*, который прикрепляется непосредственно к актину, ингибирует его деполимеризацию, индуцирует активацию NF-κB и инфламмосомы через сигнальный путь NOD-подобных рецепторов врождённого иммунитета NOD1 и NOD2 [14]. *SopE2* напрямую не связывает актин, а влияет на цитоскелет опосредованно, путём активации малых ГТФаз CDC42 и RAC1, функционирующих как гуанин-обменные факторы [15,16]. После внедрения сальмонелл в энтероциты цитоскелет клетки восстанавливается и посредством протеосомальной деградации белки *SopB*, *SopE2* и *SipA* инактивируются [17].

Полученные нами результаты показали, что предобработка животных ванкомицином вызывает усиление транскрипционной активности генов *SipA*, *SopB* и *SopE2*, за исключением *SipA* после введений *S. enteritidis*, что способствует инвазии сальмонелл в кишечник. Похожие результаты были получены после предварительного введения стрептомицина в модели сальмонелла-индуцированного колита у мышей [18].

Результаты свидетельствуют о возможности использования *B. fragilis* для коррекции сальмонелла-индуцированных изменений кишечного микробиома. Мы наблюдали при этом уменьшение уровня *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. и *Shigella* spp., а также увеличение *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium* и *Peptostreptococcus anaerobius*. Способность *B. fragilis* влиять на характер течения сальмонелла-индуцированных воспалительных заболеваний кишечника была показана и в ряде других работ [19]. *B. fragilis* являются одними из основных продуцентов КЦЖК, активирующих клетки посредством рецептора *FFAR2*, экспрессирующегося в клетках иммунной системы, эпителиоцитах кишечника и играющего важную роль в иммунной регуляции и метаболическом гомеостазе [20].

Активация *FFAR2* обуславливает снижение колит-ассоциированного воспаления, а у *FFAR2* мышей усиливается провоспалительная сигнализация в моделях острого и хронического колита, артрита и астмы [21]. Противовоспалительные эффекты КЦЖК опосредованы путём усиления секреции IL-10, угне-

тения продукции IL-12, TNF-α, IL-1β, оксида азота и снижения активности NF-κB [22]. Уменьшение концентрации КЦЖК в просвете кишечника способствует снижению числа Treg, но не влияет на количество Th1 и Th17 в толстом кишечнике [11,12]. Кроме того, полисахарид А (PSA) *B. fragilis* является важным индуктором дифференцировки Treg-клеток [23,24]. Поэтому обнаруженное нами увеличение уровня мРНК гена *FFAR2* в группах *Vancomycin + S. enteritidis + B. fragilis* и *Vancomycin + S. typhimurium + B. fragilis* закономерно сопровождается увеличением уровня мРНК транскрипционного фактора *Foxp3*, направляющего дифференцировку Т-клеток в сторону Treg и влияющего на баланс Treg/Th17 в КАЛТ.

Выводы

1. Введение *B. fragilis* экспериментальным животным, получавшим *S. enteritidis* или *S. typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином, изменяет количественный состав микробиоты в пристеночном содержимом тонкого кишечника: наблюдается уменьшение уровня *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. и *Shigella* spp., а также увеличение *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium* и *Peptostreptococcus anaerobius*.

2. Предобработка животных ванкомицином вызывает усиление транскрипционной активности генов *SipA*, *SopB* и *SopE2*, за исключением *SipA* после введений *S. enteritidis*, что способствует инвазии сальмонелл в кишечник.

3. Введение *B. fragilis* повышает уровень мРНК генов *FFAR2* и *Foxp3* в КАЛТ, а также снижает *RORγt* после введений *S. typhimurium*.

Перспективы дальнейших исследований – изучение транскриптома генов иммунного ответа в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани крыс при сальмонелла-индуцированном воспалении.

Список литературы

- [1] Role of the intestinal microbiota and the immune system / F. Purchiaroni, A. Tortora, M. Gabrielli, et al. // Medical Pharmacology Science. – 2013. – Vol. 17. – P. 323–333.
- [2] Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease / N. Kamada, S-U. Seo, G.Y. Chen, G. Núñez // Nature Reviews Immunology. – 2013. – Vol. 13. – P. 321–335.
- [3] Букина Ю.В. Определение спектра генов резистентности к антибиотикам у фенотипически резистентных штаммов пристеночной кишечной микробиоты у крыс методом ПЦР-РВ / Ю.В. Букина, А.М. Камышный, Н.Н. Полищук // Анналы Мечниковского института. – 2016. – №2. – С. 21–27.
- [4] Букина Ю.В. Визначення кількісного складу мікробіоти у пристінковому вмісті кишківника у щурів методом ПЛР-РЧ / Ю.В. Букина, О.М. Камішний, Н.М. Поліщук // Інфекційні хвороби. – 2016. – №3. – С. 78–81.
- [5] Agbor T.A. Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection / T.A. Agbor, B.A. McCormick // Cell Microbiology. – 2011. – Vol. 13. – P. 1858–69.
- [6] Exploiting host immunity: the Salmonella paradigm / J. Behnsen, A. Perez-Lopez, S.P. Nuccio, M. Raffatellu // Trends Immunology. – 2015. – Vol. 36. – P. 112–20.
- [7] Keestra-Gounder AM. Now you see me, now you don't: the interaction of Salmonella with innate immune receptors / A.M. Keestra-Gounder, R.M. Tsolis, A.J. Bäumlér // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – Vol. 13. – P. 206–16.
- [8] Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity / E. Blacher, M. Levy, E. Tatirovsky, E. Elinav // Immunology. – 2017. – Vol. 15. – P. 572–580.

- [9] Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice / M.H. Kim, S.G. Kang, J.H. Park, et al. // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 145. – P. 396–410.
- [10] The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis / P.M. Smith, M.R. Howitt, N. Panikov, et al. // *Science*. – 2013. – Vol. 341. – P. 569–573.
- [11] In Vivo Expression of Salmonella enterica Serotype Typhi Genes in the Blood of Patients with Typhoid Fever in Bangladesh / A. Sheikh, R.C. Charles, N. Sharmeen, et al. // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2011. – Vol. 5(12). – e1419.
- [12] The inflammatory cytokine tumor necrosis factor modulates the expression of Salmonella typhimurium effector proteins / J. Ma, Y.G. Zhang, Y. Xia, J.J. Sun // *Inflammation*. – 2010. – Vol. 12. – P. 42.
- [13] Que F. Salmonella pathogenicity island 1 (SPI-1) at work / F. Que, S. Wu, R. Huang // *Curr Microbiology*. – 2013. – Vol. 66. – P. 582–7.
- [14] LaRock D.L. Salmonellae interactions with host processes / D.L. LaRock, A. Chaudhary, S.I. Miller // *Nature Review Microbiology*. – 2015. – Vol. 13. – P. 191–205.
- [15] Keestra A.M. Detection of enteric pathogens by the nodosome / A.M. Keestra, A.J. Bäumlner // *Trends Immunology*. – 2014. – Vol. 35. – P. 123–130.
- [16] Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1 / A.M. Keestra, M.G. Winter, J.J. Auburger et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 496. – P. 233–237.
- [17] Narayanan L.A. Ubiquitination as an efficient molecular strategy employed in salmonella infection / L.A. Narayanan, M.J. Edelman // *Frontiers Immunology*. – 2014. – Vol. 25. – P. 558.
- [18] Hapfelmeier S. Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice / S. Hapfelmeier // *Infection Immunology*. – 2004. – Vol. 72. – P. 809.
- [19] The Bactericidal Lectin RegIII β Prolongs Gut Colonization and Enteropathy in the Streptomycin Mouse Model for Salmonella Diarrhea / T. Miki, R. Goto, M. Fujimoto, et al. // *Cell Host Microbe*. – 2017. – Vol. 21. – Issue 2. – P. 130–131.
- [20] Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids / R. Corrêa-Oliveira, J.L. Fachi, A. Vieira, et al. // *Clinical & Translational Immunology*. – 2016. – Vol. 22.5(4). – e73.
- [21] Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 / K.M. Maslowski, A.T. Vieira, A. Ng, et al. // *Nature*. – 2009. – Vol. 29. – P. 1282–6.
- [22] Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases / M. Sun, W. Wu, Z. Liu, Y. Cong // *Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 52. – P. 1–8.
- [23] Surana N.K. The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from B. fragilis PSA / N.K. Surana, D.L. Kasper // *Immunology Review*. – 2012. – Vol. 245. – P. 13–26.
- [24] Zeng H. Metabolic control of regulatory T cell development and function / H. Zeng, H. Chi // *Trends Immunology*. – 2015. – Vol. 36. – P. 3–12.

References

- [1] Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., et al. (2013) Role of the intestinal microbiota and the immune system. *Medical Pharmacology Science*, 17, 323–333.
- [2] Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 13, 321–335. doi:10.1038/nri3430.
- [3] Bukina, Y. V., Kamyshny, A. M., & Polishchuck, N. N. (2016) Opredelenie spektra genov rezistentnosti k antibiotikam u fenotipicheski rezistentnykh shtammov pristenochnoj kishhechnoj mikrobyoty u krysa metodom PCR-RV [Determination of the spectrum of antibiotic resistance genes have phenotypic resistant strains of parietal intestinal microbiota in rats by RT-PCR]. *Annaly Mechnikovskogo instituta*, 2, 21–27. [In Russian].
- [4] Bukina, Yu. V., Kamyshnyi, O. M., & Polishchuck, N. M. (2016) Vyznachennia kilkisnoho skladu mikrobyoty u prystinkovomu vmisti kyshtkivnyka u shchuriv metodom PLR-RCh [Determination quantitative composition of the microbiota in parietal intestinal surface in rats by PCR real-time]. *Infektsiini khvoroby*, 3, 78–81. [In Ukrainian].
- [5] Agbor, T. A., & McCormick, B. A. (2011) Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cell Microbiology*, 13, 1858–69. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01701.x.
- [6] Behnsen, J., Perez-Lopez, A., Nuccio, S. P., & Raffatellu, M. (2015) Exploiting host immunity: the Salmonella paradigm. *Trends Immunology*, 36, 112–20. doi: 10.1016/j.it.2014.12.003.
- [7] Keestra-Gounder, A. M., Tsois, R. M., & Bäumlner, A. J. (2015) Now you see me, now you don't: the interaction of Salmonella with innate immune receptors. *Natura Review Microbiology*, 13, 206–16. doi: 10.1038/nrmicro3428.
- [8] Blacher, E., Levy, M., Tatirovsky, E., & Elinav, E. (2017) Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *Immunology*, 15, 572–580. doi: 10.4049/jimmunol.1601247.
- [9] Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M., & Kim, C. H. (2013) Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*, 145, 396–410. doi: 10.1053/j.gastro.2013.04.056.
- [10] Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly, Y. M., et al. (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341, 569–573. doi: 10.1126/science.1241165.
- [11] Sheikh, A., Charles, R. C., Sharmeen, N., Rollins, S. M., Harris, J. B., Bhuiyan, M. S., et al. (2011) In Vivo Expression of Salmonella enterica Serotype Typhi Genes in the Blood of Patients with Typhoid Fever in Bangladesh. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1419. doi: 10.1371/journal.pntd.0001419.
- [12] Ma, J., Zhang, Y. G., Xia, Y., & Sun, J. (2010) The inflammatory cytokine tumor necrosis factor modulates the expression of Salmonella typhimurium effector proteins. *Inflammation*, 12, 42. doi: 10.1186/1476-9255-7-42.
- [13] Que, F., Wu, S., & Huang, R. (2013) Salmonella pathogenicity island 1 (SPI-1) at work. *Curr Microbiology*, 66, 582–7. doi: 10.1007/s00284-013-0307-8.
- [14] LaRock, D. L., Chaudhary, A., & Miller, S. I. (2015) Salmonellae interactions with host processes. *Nature Review Microbiology*, 13, 191–205. doi: 10.1038/nrmicro3420.
- [15] Keestra, A. M., & Bäumlner, A. J. (2014) Detection of enteric pathogens by the nodosome. *Trends Immunology*, 35, 123–130. doi: 10.1016/j.it.2013.10.009.
- [16] Keestra, A. M., Winter, M. G., Auburger, J. J., Frässle, S. P., Xavier, M. N., Winter, S. E., et al. (2013) Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature*, 496, 233–237. doi: 10.1038/nature12025.
- [17] Narayanan, L. A., & Edelman, M. J. (2014) Ubiquitination as an efficient molecular strategy employed in salmonella infection. *Frontiers Immunology*, 25, 558. doi: 10.3389/fimmu.2014.00558.
- [18] Hapfelmeier, S. (2004) Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection Immunology*, 72, 795–809.
- [19] Miki, T., Goto, R., Fujimoto, M., Okada, N., & Hardt, W. D. (2017) The Bactericidal Lectin RegIII β Prolongs Gut Colonization and Enteropathy in the Streptomycin Mouse Model for Salmonella Diarrhea. *Cell Host Microbe*, 21(2), 130–131.
- [20] Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. (2016) Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*, 22, 73. doi: 10.1038/cti.2016.17.
- [21] Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., et al. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 29, 1282–6. doi: 10.1038/nature08530.
- [22] Sun, M., Wu, W., Liu, Z., & Cong, Y. (2017) Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 52, 1–8. doi: 10.1007/s00535-016-1242-9.
- [23] Surana, N. K., & Kasper, D. L. (2012) The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from B. fragilis PSA. *Immunology Review*, 245, 13–26. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01075.x.
- [24] Zeng, H., & Chi, H. (2015) Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunology*, 36, 3–12. doi: 10.1016/j.it.2014.08.003.

Сведения об авторах:

Букина Ю. В., ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Камышный А. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Полищук Н. Н., канд. мед. наук, старший преподаватель каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Топол И. А., канд. биол. наук, ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Відомості про авторів:

Букина Ю. В., асистент каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Камішний О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Поліщук Н. М., канд. мед. наук, старший викладач
каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький
державний медичний університет, Україна.
Топол І. О., канд. біол. наук, асистент каф. мікробіології,
вірусології та імунології, Запорізький державний медичний
університет, Україна.

Information about authors:

Bukina Yu. V., Assistant of the Department of Microbiology, Virology
and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Kamyshnyi A. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the
Department of Microbiology, Virology and Immunology,
Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Polishchuck N. N., MD, PhD, Senior Lecturer of the Department
of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State
Medical University, Ukraine.

Topol I. A., PhD, Assistant of the Department of Microbiology,
Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University,
Ukraine.

Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 20.02.2017

Після доопрацювання / Revised: 01.03.2017

Прийнято до друку / Accepted: 02.03.2017