

**І.Ю. Головач<sup>1</sup>**, д-р мед. наук, професор, Заслужений лікар України, керівник Центру ревматології,

**Є.Д. Єгудіна<sup>2</sup>**, д-р мед. наук, доцент кафедри внутрішньої медицини З

<sup>1</sup> Клінічна лікарня «Феофанія» Державного управління справами, м. Київ

<sup>2</sup> ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія» МОЗ України

# Роль мікробіому при спондилоартритах. Трансплантація фекальної мікробіоти при спондилоартритах готова до клінічних випробувань?

**С**пондилоартрити (СпА) – це група клінічно та генетично споріднених розладів, які характеризуються хронічним запаленням осового скелета (сакроілеїт і спондиліт), периферійних суглобів та/або наявністю ентезитів. У 2009 р. Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) запропонувала нові класифікаційні критерії для осового та периферійного СпА. Визнано, що аксіальний СпА поєднує в собі як рентгенографічні, так і нерентгенографічні форми, а периферійний СпА, у свою чергу, охоплює реактивний артрит (РеА), спондилоартритичний варіант псоріатичного артриту (ПСА), ювенільний СпА (ентезит-пов'язаний артрит; ЕПА), артрит, пов'язаний із запальними захворюваннями кишечника (ЗЗК) й інші форми артриту, які відповідають критеріям СпА (недиференційовані форми СпА) [78]. Це так звані клінічні фенотипи СпА. З часом стало очевидним, що ці різні захворювання взаємопов'язані з урахуванням клінічних характеристик, обтяженого спадкового анамнезу та генетичної схильності [111]. Як відомо, анкілозивний спондиліт (АС) є прототипом СпА. Це захворювання характеризується запаленням осового скелета, тобто сакроілеальних суглобів (вони зазвичай утягуються першими) та хребта (спондиліт), з або без периферійного артриту або ентезиту.

Загально визнано, що СпА обумовлені хронічною запальною реакцією, яка розвивається у генетично схильних пацієнтів, але основна причина цього патологічного процесу досі невідома. Найважливішим фактором генетичної схильності до СпА є головний комплекс гістосумісності класу I – поверхневий антиген HLA-B27 (людський лейкоцитарний антиген В27) [85]. Водночас велика увага приділяється питанню ролі мікроорганізмів у провокуванні виникнення хвороби. На сьогодні доведено роль специфічних шлунково-кишкових

та урогенітальних патогенів, які обумовлюють розвиток РеА, але в інших підтипах СпА не було виявлено жодного специфічного патогенетичного мікроорганізму. Згідно з даними літератури, на сьогодні існують новітні дослідження з виявлення провокуючих факторів, які визначають розвиток СпА, імунних реакцій-відповідей на бактерії-коменсали або змін з боку бактеріальної «спільноти» мікроорганізмів-резидентів (дисбактеріоз).

**З'явилися переконливі докази того, що мікробіом у тварин, які мають клінічні ознаки, схожі на АС, відіграє значущу роль у розвитку захворювання, при цьому деякі експерименти показують, що зміна мікробіому може зменшити рівень активності хвороби [97].**

Одним з визнаних способів корегування мікробіому є використання трансплантатів фекальної мікробіоти, яке, як доведено, є ефективним при лікуванні коліту, спричиненим *Clostridium difficile* [66]. Це може бути потенційною терапевтичною стратегією для пацієнтів зі СпА у майбутньому.

У цьому огляді обговорюються докази участі мікробіому в патогенетичних побудовах СпА, дані взяті з клінічних досліджень та досліджень на тваринах, з використанням наукових баз CENTRAL, MEDLINE, PubMed і Embase, проведений систематичний огляд літератури з 1993 по 2018 р. Також розглядаються питання зміни мікробіоти кишечника як інноваційної та перспективної форми лікування СпА.

## Що таке мікробіом?

Мікробіом – це термін, який використовується для опису величезної спільноти мікробів та їх генетичних елементів. Мікробіом (мікробіота) людини є сукупністю

мікробіоценозів, які колонізують усі поверхні людського тіла, що контактують з навколишнім середовищем, у тому числі шкіру, дихальну систему, травний тракт і сечостатевою систему. Загалом чисельність клітин мікробних популяцій становить не менше ніж 100 трильйонів [100]. Ця спільнота мікроорганізмів охоплює гриби, віруси, найпростіші, бактерії; останні є найбільш глибоко дослідженою групою в цій екосистемі та мають (відносно) більш глибоку функціональну характеристику [100].

Функції мікробіому різноманітні, серед них участь у безлічі важливих метаболічних процесів, пов'язаних з розвитком і дозріванням слизової оболонки та системним імунітетом [92]. Аналіз мікробіому кишечника в популяції здорових осіб виявив понад 1000 різних бактеріальних видів [64]; у середньому здорову особу колонізує приблизно 100–200 таких таксонів, їх метагеном (сумарне число генів мікробіоти) принаймні в 100 разів більший за геном людини [100]. Незважаючи на те, що мікробіомічний профіль кишечника відрізняється між індивідуумами, існує загальний патерн, поділений на підцарства, таксономічні групи, родини, види та роди [39].

Останні досягнення, встановлені за допомогою методу секвенування нового покоління, уможливили краще характеризувати мікробіом кишечника людини. Один із способів, зокрема 16S рРНК-секвенування, уможливив виявляти бактерії до рівня роду або виду і чітко описувати мікробні популяції, незалежно від того, чи мікроорганізми наявні, і якщо так, останні можна культивувати. Детальний аналіз нуклеотидних послідовностей за допомогою секвенування гена 16S рибосомальної РНК ампліфікованих бактеріальних нуклеїнових кислот, отриманих з фекалій або біоптатів слизової оболонки кишечника зразків [117], що був доповнений даними метагеномного секвенування, дав змогу скласти загальне уявлення про мікробне різноманіття.

Отже, у здоровій людини домінують бактерії, що належать до типів *Firmicutes* (65–80% усіх клонів), *Bacteroidetes* (близько 23%) і *Actinobacteria* (близько 3%). У менших кількостях наявні бактерії типів *Proteobacteria* (1%) і *Verrucomicrobia* (0,1%) [39, 64]. У сироватці хворих на ЗЗК виявлено декілька антитіл до коменсальних бактерій, що підтверджує гіпотезу підвищеної чутливості основного захворювання до цих мікроорганізмів. Сюди відносять антитіла проти CBir1 flagellin, IgA та IgG анти-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCAs), IgA-антитіла проти білка зовнішньої мембрани *Escherichia coli*, IgA-антитіла проти *Pseudomonas fluorescens*; причому знайдений зв'язок цих антитіл з перинуклеарними антинейтрофільними цитоплазматичними антитілами (pANCA) [60]. Це також підтверджує зв'язок між аутоімунною патологією та станом мікробіоти кишечника «хазяїна».

### СпА та запалення кишечника

У клініці та патогенезі ЗЗК і СпА можна знайти багато доказів співіснування цих захворювань, що дозволяє гіпотезувати про існування спільного патогенетичного механізму. У 60–70% пацієнтів зі СпА за допомогою мікроскопії виявлені зміни з боку кишечника, подібні до хвороби Крона (ХК) [67]. Інше дослідження

показало, що протягом 5 років у понад 26% хворих на СпА розвивається клінічне ЗЗК [34], і навпаки, осьовий СпА, визначений за допомогою критеріїв ASAS, спостерігається у 19–20% хворих на ЗЗК [94, 95].

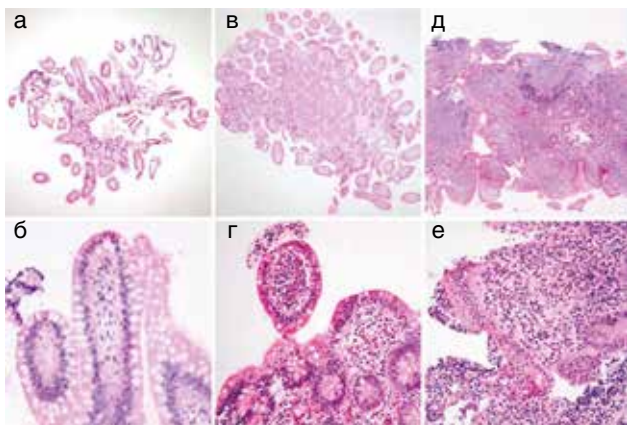
Надзвичайно цікавим є той факт, що ремісія суглобового запалення позитивно корелювала зі зменшенням запалення у кишечнику, а хронічний артрит був пов'язаний з його персистенцією [35]. У пацієнтів зі СпА та хронічним ЗЗК спостерігалось збільшення кількості інцидентів загострення аксіального СпА порівняно з тими, що мали нормальну гістологічну картину при біопсії кишечника [48, 115], причому запалення кишечника при СпА було незалежним чином пов'язане з молодим віком, чоловічою статтю та високою активністю захворювання, визначеною за допомогою індексу активності захворювання BASDAI, а також обмеженою рухливістю хребта, визначеною за допомогою індексу функціональних порушень (BASFI) [115]. Також слід підкреслити, що в більшості хворих на АС спостерігається збільшення рівня кальпротектину – маркера кишкового запалення [58].

Були також виявлені численні фактори взаємозв'язку між пацієнтами із ЗЗК та СпА. Так, проведення систематичної ілеоколоноскопії продемонструвало, що приблизно 50% усіх хворих на СпА мали мікроскопічні ознаки запалення кишечника без відповідних клінічних симптомів ураження травного тракту [86]. Найчастіше при СпА в патологічний процес утягується клубова кишка, її термінальний відділ і ілеоцекальний кут.

Два види запалення можна виділити на основі гістопатологічних характеристик, а не тривалості захворювання: *гострий тип*, що нагадує інфекційний ентероколіт (гранулоцитарна інфільтрація з нормальною структурою слизової оболонки), і *хронічний тип* з порушенням архітекτονіки слизової оболонки та хронічним лімфоплазматичним клітинним інфільтратом у слизовій оболонці кишечника (рис. 1) [114].

У хворих на СпА під час біопсії кишечника виявляють гістологічні зміни (наприклад, саркоїдні гранульоми, афтоїдні виразки, мікрогранульоми) вельми подібні до тих, що спостерігають при ХК, що свідчить про те, що це мікроскопічне запалення може бути ранньою субклінічною формою ХК. Це припущення посилюється тим фактом, що пацієнти зі СпА і хронічним мікроскопічним запаленням кишечника мають підвищений ризик (до 20%) розвитку розгорнутої форми ХК [116]. Наступні дослідження продемонстрували, що запалення кишечника та суглобів були чітко пов'язані.

Так, ремісія суглобового запалення збігалась з ремісією запалення кишечника й водночас у всіх пацієнтів з суглобовою ремісією була нормальною гістологія кишки при повторному дослідженні (незважаючи на попередній або поточний прийом нестероїдних протизапальних препаратів). Цікаво, що хронічне запалення кишечника при СпА пов'язане з більш інтенсивним набряком кісткової тканини сакроілеальних зчленувань та швидшою еволюцією до АС [116]. Це свідчить про значний вплив кишкового запалення на ступінь тяжкості і прогноз СпА. У дослідженні R. Scarpa і співавт. (2000) було виявлено, що у 60% пацієнтів з псоріатичним СпА наявне мікроскопічне запалення кишечника за відсутності клінічних симптомів [89].



**Рис. 1.** Різні варіанти біоптатів клубової кишки в пацієнтів зі СпА: а – нормальна гістологічна картина слизової оболонки, що характеризується наявністю тонких ворсинок і прямих крипт; відсутня інфільтрація запальними клітинами (гематоксилін і еозин; оригінальне збільшення  $\times 4$ ); б – більше збільшення підкреслює відсутність інфільтрації запальними клітинами в епітелії ворсинок (гематоксилін і еозин; оригінальне збільшення  $\times 20$ ); в – фокальне активне запалення слизової оболонки зі збереженою архітектонікою ворсинок і крипт (гематоксилін і еозин; оригінальне збільшення  $\times 4$ ); г – збільшення кількості гранулоцитів в епітелії ворсинок і крипт з добре збереженим епітелієм (гематоксилін і еозин; оригінальне збільшення  $\times 20$ ); д – хронічна щільна інфільтрація запальними клітинами слизової оболонки з перебудовою ворсинок і крипт (гематоксилін і еозин; оригінальне збільшення  $\times 4$ ); е – значна гранулоцитарна інфільтрація ворсинок епітелію та хронічний щільний лімфоплазматичний клітинний інфільтрат у слизовій оболонці (гематоксилін і еозин; оригінальне збільшення  $\times 20$ ). Рисунок адаптовано авторами з [115].

### Спондилоартрит та мікробіота

Загальновідомо, що ЗЗК є мікробіом-опосередкованим захворюванням [42, 56, 105], а за допомогою повногеномних досліджень було визначено, що генні варіанти, які пов'язані з ЗЗК, не лише регулюють імунну відповідь слизової оболонки, а й асоційовані з АС [29, 75; Parkes M, 2013; Cortes A, 2013]. З іншого боку, фактори транскрипції EOMES, RUNX3 і TBX21 та цитокінові рецептори інтерлейкіну-7R (IL-7R) та IL-23R, які патогенетично пов'язані з АС, беруть участь у формуванні імунних властивостей слизової оболонки, наприклад, відіграючи важливу роль у розвитку вроджених лімфоїдних клітин [29]. Усе вищеперераховане є переконливими доказами того факту, що запалення кишечника залучене до патогенезу та прогресування СпА.

У науковій літературі є достатньо доказів того, що мікробіом кишечника змінюється при СпА [27, 31, 91, 101, 102, 109]. Перший комплексний аналіз мікробіоти кишечника при СпА був виконаний у 2002 р.; за допомогою методу секвенування нового покоління було визначено зміни складу мікробіоти при СпА. У дослідженні, яке проводили за допомогою методу денатуруючого градієнтного гел-електрофорезу, порівнювали мікробіом кишечника із застосуванням фекальних зразків у пацієнтів з АС та групою контролю, порівнянню за віком [101].

Дослідники виявили високий ступінь колонізації сульфатредукуючими бактеріями і збільшення концентрації сульфатів у кишечнику пацієнтів, хворих на АС. При проведенні 16S rRNA-секвенування було визначено, що мікробний профіль термінального відділу клубової кишки значно відрізнявся між пацієнтами з АС та здоровими пацієнтами групи контролю при біопсії: у пацієнтів з АС виявляли представників більше ніж 5 мікробних родин: *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Rikenellaceae* та *Ruminococcaceae* [18, 31] та зниження відносної чисельності бактерій родин

*Prevotellaceae* та *Veilonellaceae*. У термінальному відділі клубової кишки у пацієнтів з АС порівняно зі здоровими (група контролю) спостерігалася більша мікробна різноманітність без загальної зміни мікробного навантаження [30].

Незважаючи на зниження концентрації *Veilonellaceae*, колонізація бактеріями роду *Dialister* з цієї родини позитивно корелювала з активністю АС. Це було переконливо продемонстровано й доведено в наступному дослідженні: тенденція до збільшення мікробного різноманіття при високому ступені активності СпА проти низького порівняно з групою контролю виявлена R.Y. Tito та співавт. (2016) [108], де зіставляли дані біопсії порожньої та товстої кишок пацієнтів зі СпА та здорових осіб. Колонізація бактеріями роду *Dialister* корелювала з активністю АС за шкалою ASDAS: більший вміст *Dialister* спостерігався за даними біопсії на наявності запалення у порівнянні з випадками відсутності останнього та під час гістологічних досліджень, які були проведені у здорових пацієнтів групи контролю [108].

Отримані недавні цікаві результати стосовно *Ruminococcaceae gnavus* показали, що в пацієнтів зі СпА спостерігають триразове збільшення їх кількості порівняно з пацієнтами з ревматоїдним артритом (РА) і здоровими особами групи контролю [18]. Про значне заселення кишечника цим збудником раніше повідомлялось тільки в пацієнтів із ЗЗК [77]. Наступний аналіз показав, що *R. gnavus* був найпоширенішим у підгрупі пацієнтів зі СпА, які мали в анамнезі ЗЗК [18].

Найтісніший зв'язок між запаленням кишечника та суглобів встановлено при *PeA*, у цьому випадку, як відомо, захворювання спричинюють шлунково-кишкові інфекції: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* та ін. Ризик розвитку *PeA* збільшується у носіїв HLA-B27. Більше того, було виявлено, що приблизно у 20% пацієнтів з *PeA* протягом 10–20 років розвивається АС, особливо якщо вони є серопозитивними за HLA-B27 [102].

У дітей з *EPA* виявлено зменшення у фекаліях концентрації *Faecalibacterium prausnitzii* порівняно зі здоровими дітьми групи контролю [102]. Як відомо, *F. prausnitzii* має протизапальні властивості, виробляючи бутират. Під час дослідження A.R. Erickson і співавт. (2012) у пацієнтів із ЗЗК виявлено зменшення кількості не лише самого бутирату, а також ферментів, залучених до його вироблення [40]. Відносно менша різноманітність мікробіоти кишечника була виявлена у хворих на *PCA*: зниження концентрації *Akkermansia muciniphila* та *Ruminococcus* spp., концентрація яких також зменшена при ЗЗК [91]. Таким чином, перераховані вище види бактерій можуть бути пов'язані з патогенезом і прогресуванням захворювання або принаймні служити потенційними новими біомаркерами СпА.

Ще одне «мікробне» місце, яке цікаво досліджувати, – це порожнина рота. Асоціації між інфекціями пародонта, пероральною мікробіотою та РА були вивчені достатньо широко. У недавньому дослідженні порівнювали стан мікробіому ротової порожнини в пацієнтів з аксіальним СпА порівняно зі здоровими особами групи контролю за допомогою 16S rRNA секвенування. У пацієнтів з аксіальним СпА виявлено значно більшу поширеність періодонтиту порівняно з групою контролю. Проте не спостерігали значної різниці в структурі або різноманітності

бактерій. Також жодних специфічних бактеріальних таксонів, пов'язаних зі СпА, не було визначено; ці негативні результати можуть бути помилковими через невелику кількість вибірки в дослідженні [17]. Загалом, обговорювані вище дослідження свідчать, що зміни в мікробіомі при СпА можуть обумовлювати позакишкові прояви СпА.

### Роль мікробіоти в тваринних моделях СпА

Найбільш переконливі докази того, що СпА є хворобою, обумовленою змінами мікробіому, отримані в дослідженнях на тваринах [9, 46]. У трансгенній моделі Fischer F344 пацюків розвивалося СпА-подібне запальне захворювання, що характеризувалося рецидивними колітами, сакроілеїтом та периферійним артритом задніх кінцівок [50]. Цікаво, що при вирощуванні цих щурів у стерильних, безбактеріальних, умовах коліт і периферійний артрит у них не розвивалися [106], а колонізація їхнього кишечника *Bacteroides vulgaris* провокувала виникнення коліту [82]. Примітно, що *Lactobacillus rhamnosus GG* запобігають рецидиву коліту [36]. У моделі SKG мишей з хронічним автоімунним артритом при вирощуванні у стерильних умовах СпА не розвивався; однак після ін'єкції курдлану (компонент стінки бактеріальних або грибкових клітин) у цих тварин розвивався клінічний фенотип, характерний для СпА [83].

HLA-B27- $\beta_2$ -мікроглобулін трансгенні щури (Lewis модель) клінічно мали тяжкий артрит за відсутності симптомів коліту [63]. Однак у цій моделі мікробіальний профіль сліпого відділу кишечника суттєво відрізнявся від групи контролю: спостерігалось

відносно збільшення кількості *Prevotella* і зменшення *Rikenellaceae*. Цікаво, що з посиленням запалення кишечника спостерігалось й збільшення кількості *Prevotellaceae* і *Rikenellaceae*.

Загальновідомо, що при СпА IL-23 є вирішальним патогенетичним чинником у сприянні виробленню CD4 Т-хелперами IL-17; це, звісно, пояснює факт патогенетичної асоціації комплексу IL-23/IL-17 з виникненням СпА [93]. Сегментовані нитчасті бактерії (СНБ) є коменсалами, вони індуюють секрецію IL-17; це було доведено на моделях мишей [54]. Уведення СНБ у кишечник гнотобіотичних К/ВхN мишей було достатньо для індукції відповіді у вигляді Th17-обумовленого артриту [119]. Нейтралізація IL-17 запобігала розвитку артриту у цих мишей за рахунок прямого впливу на В-клітинну регуляцію формування зародкових центрів. Крім того, було показано, що F344 HLA-B27/ $\beta_2$ -мікроглобулін у трансгенних щурів мав ранню експансію Th17-клітин кишечника порівняно з групою контролю [9]. У таблиці наведено узагальнений стан мікробіоти в пацієнтів та моделях тварин зі СпА.

Таким чином, говорячи про механізми зв'язку мікробіоти кишечника і СпА, необхідно виділити 2 аспекти. При СпА фактори генетичної схильності впливають на те, якою буде відповідь на бактерії, що врешті-решт призводить до дисбактеріозу та запалення. І навпаки, склад і метаболічна активність кишкової мікробіоти може впливати на імунну відповідь «хазяїна», тим самим сприяючи виникненню або загостренню запалення.

Таблиця. Стан мікробіоти у пацієнтів та моделях тварин зі СпА

Захворювання	Метод дослідження	Локалізація дослідження	Зміна мікробіоти порівняно з групою контролю	Джерело
Анкілозивний спондиліт	DGGE + FISH	Кал	↑ Сульфат-редуючі бактерії N.B. Не було змін кількості <i>Klebsiella pneumoniae</i> чи <i>Bacteroides vulgatus</i>	[101]
Анкілозивний спондиліт	16S rRNA seq.	Біопсія клубової кишки	↑ <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Veillonellaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Porphyromonadaceae</i> та <i>Bacteroidaceae</i> ↓ <i>Ruminococcaceae</i> та <i>Rikenellaceae</i> N.B. Не було змін кількості <i>Klebsiella</i> spp. чи PeA-асоційованих бактерій	[30]
Аксіальний СпА ± запалення кишечника	16S rRNAseq.	Біопсія клубової + ободової кишки	↑ <i>Dialister</i> (частина <i>Veillonellaceae</i> ) ~ запаленню кишківника та ASDAS	[108]
Аксіальний СпА	16S rRNAseq.	Слизова оболонка ясен	Більша кількість періодонтитів при СпА	[17]
Ентезит-пов'язаний артрит (ювенільний СпА)	16S rRNAseq.	Кал	↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (частина <i>Clostridiaceae</i> ) та <i>Lachnospiraceae</i> ↑ <i>Bifidobacterium</i> ↑ <i>Akkermansia muciniphila</i> ( <i>Verrucomicrobiaceae</i> ) ↑ <i>Bacteroides</i>	[102]
HLA-B27 щури лінії Fisher 344	16S rRNAseq.	Кал	↓ <i>Firmicutes</i> spp. ↑ <i>Proteobacteria</i> spp. ↑ <i>Akkermansia muciniphila</i> (пов'язано з розвитком артриту)	[9]
Lewis HLA-B27 трансгенні щури (F1 21–3 × 283–2) без запалення кишечника	16S rRNAseq.	Кал	↑ <i>Prevotella</i> spp. ↓ <i>Bacteroides vulgatus</i> ↓ <i>Rikenellaceae</i>	[63]

**Примітки:** тип *Firmicutes* охоплює родини *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* та *Veillonellaceae*. Тип *Bacteroidetes* охоплює родини *Prevotellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Bacteroidaceae* та *Rikenellaceae*. Тип *Proteobacteria* охоплює родини *Campylobacteraceae* та *Enterobacteriaceae*. Тип *Verrucomicrobia* охоплює родину *Verrucomicrobiaceae*. Тип *Actinobacteria* охоплює родину *Bifidobacteriaceae*. DGGE – денатуруючий градієнтний гель-електрофорез. FISH – флуоресцентна гібридизація *in situ*. 16S rRNA seq – секвенування гена 16S рибосомальної РНК ампліфікованих бактеріальних нуклеїнових кислот, отриманих з фекалій або біоптатів слизової оболонки кишечника.

## Фактори, що беруть участь у відповіді на мікробіоту кишечника

### Кишковий епітеліальний бар'єр

За звичайних умов небажані імунні реакції, спрямовані на коменсальні бактерії кишечника або спричинені ними, уникаються за рахунок двох основних механізмів. По-перше, вплив мікроорганізмів на імунну систему обмежується фізичним бар'єром, яким є кишковий епітелій та слиз. По-друге, імунні реакції контролюються через толерогенність мікросередовища слизової оболонки, яка характеризується наявністю спеціалізованих дендритних клітин (ДК) і макрофагів, а також високим рівнем протизапальних медіаторів.

У підтримці функції кишкового бар'єра також відіграють важливу роль *клітини Панета*, які продукують антимікробні пептиди та секреторний IgA (sIgA), останній зв'язує і нейтралізує токсини та патогени в просвіті кишечника [1, 103]. Значна експресія антимікробних пептидів, які продукуються клітинами Панета, спостерігалась в кишечнику пацієнтів з АС та субклінічним запаленням кишечника, а також у хворих на ХК з низьким ступенем запалення, тоді як у пацієнтів з ХК і високим ступенем запалення кишечника відзначалося суттєве зменшення кількості цих клітин [24]. У HLA-B27 трансгенних щурів спостерігалось посилення обволікання кишкових бактерій sIgA [8], а в деяких дослідженнях підвищений сироватковий вміст sIgA зафіксований у пацієнтів зі СпА [7]. Незрозуміло, чи ці зміни представляють компенсаторні механізми у відповідь на підвищену експозицію бактерій або самі по собі є причиною дисбактеріозу (втрата захисних коменсальних організмів).

### Роль вродженої імунної системи

Клітини вродженого імунітету «відчувають» антигени через обмежену кількість інваріантних рецепторів, здатних визнавати певні патологічні мікробні елементи, відомі як патоген-асоційовані молекулярні структури (ПАМС). Ці сигнальні рецептори належать до патерн-розпізнавальних – рецептори-розпізнавання патернів (РРП) і впізнають широкий клас збудників. Прикладами цього є трансмембранні Toll-подібні рецептори (TLR) та NODs-рецептори.

TLR4 зв'язує ліпополісахариди (ЛПС) – складову грамнегативних бактерій. Це зв'язування призводить до активації шляху сигналізації ядерного фактора κВ (NF-κВ) та прозапальної реакції (наприклад, секреції IL-23). Дві мутації в TLR4 (Asp299Gly та Thr399Ile) були пов'язані зі схильністю до ЗЗК, але зв'язку цих факторів з розвитком АС не було встановлено [2]. Також у SKG моделі мишей індукція ілеїту (але не артриту) була залежною від TLR4. З іншого боку, експресія TLR2 і TLR4 у запалених синовіальних оболонках виявилася вищою у пацієнтів зі СпА, ніж з РА [33].

Добре відомо, що деякий поліморфізм у NOD2/CARD15 пов'язаний зі схильністю до ХК з наступним розвитком СпА та підвищує ризик хронічного мікроскопічного запалення кишечника [61]. Поліморфізм у CARD9 (білок, який кодується однойменним геном) асоційований як зі СпА, так і з ЗЗК [29]. CARD9 кодує білок, необхідний для сигналізації РРП dectin-1 і dectin-2 (лектини С-типу). Ці рецептори визнають бета-глюкан – компонент бактеріальних і грибових клітинних стінок. Дефіцит CARD9 у мишей призводить до порушення репарації епітелію кишечника [99].

З іншого боку, введення бета-глюкану у SKG модель мишей призводить до захворювання за типом СпА [86].

### Процесинг мікроорганізмів

Макрофаги у пацієнтів зі СпА відповідають на інвазію мікроорганізмів, з одного боку, шляхом збільшення прозапальної секреції цитокінів, а з іншого – зменшенням кліренсу внутрішньоклітинних бактерій, що, у свою чергу, призводить до поширення мікроорганізмів та системного запалення. Встановлено, що концентрація макрофагів, позитивних за CD163 (маркера альтернативної активації макрофагів), значно збільшена в синовії саме при СпА порівняно з РА. Концентрація CD163-макрофагів була також більшою в слизовій оболонці кишки хворих на СпА та ХК [15]. Крім того, було показано, що CD163 асоціюється з порушенням активації лімфоцитів в синовії при АС, що, можливо, призводить до порушеного кліренсу внутрішньоклітинних бактерій [16]. З іншого боку, макрофаги периферійної крові у пацієнтів з АС показали вищу продукцію IL-23 у відповідь на ЛПС порівняно з групою контролю здорових осіб [121]. Спостерігалось також зниження продукції IL-10 мононуклеарними клітинами периферійної крові у хворих на АС у відповідь на автологічні *Bacteroides*, а трансгенні HLA-B27 щури також демонстрували внутрішній дефект продукції IL-10 у відповідь на TLR-ліганди [112].

### Вроджені лімфоїдні клітини (ВЛК)

ВЛК нещодавно описаний тип клітин, здатних швидко виділяти великі кількості цитокінів при стимуляції стресовими сигналами, мікробними спільнотами або іншими цитокінами [38]. ВЛК 3-го типу відіграють надзвичайно важливу роль для імунітету кишечника. Вони секретують IL-22 (кишковий IL-22 необхідний для епітеліальної цілісності та репарації) та IL-17 і експресують Th17-асоційований фактор транскрипції RORγt [71]. ВЛК 3-го типу безпосередньо індукують загибель коменсальних бактерій, специфічних до CD4 Т-клітин [51]. Недавнє дослідження показало збільшення ВЛК 3-подібних клітин (хоча і RORγt негативних) у кишечнику, синовіальній рідині (СР) та кістковому мозку пацієнтів з АС, які мали здатність продукувати IL-17 і IL-22 та експресувати α4β7 [25].

### Адаптивний імунітет

HLA-B27 є найважливішим та найвідомішим фактором генетичної схильності до СпА [19]. Як молекула МНС класу I, фізіологічна роль HLA-B27 полягає в презентації Т-клітинам CD8 артритогенного пептиду, що зумовлює автоімунну відповідь, спрямовану проти власних тканин організму. Отже, було припущено, що деякі алелі В27 можуть зв'язувати специфічні бактеріальні пептиди і представляти їх цитотоксичним Т-клітинам, які потім перехресно реагують з ендогенними антигенами, спричинюючи хронічне запалення (артритогенна пептидна теорія) [59].

Автореактивні CD8 Т-клітини, специфічні для хрящових пептидів, були виявлені у СР пацієнтів з АС [11]. Бактеріальні антиген-специфічні Т-клітини при РеА також були CD4+. Також вони продемонстрували ознаки порушеної Th1-відповіді, що пригнічує ефективний кліренс бактерій [107]. Крім того, ці CD4+ Т-клітини реагували не лише на бактеріальні антигени, а й на сам HLA-B27, можливо, через перехресну реактивність: HLA-B27 містить амінокислотні послідовності, ідентичні до тих, що виявляють у грамнегативних

бактеріальних білках [41]. Було встановлено, що моноклональні анти-HLA-B27 зв'язують антигени *Klebsiella*, *Shigella* та *Yersinia* [4].

Кілька досліджень вивчали відповіді CD4 Т-клітин щодо специфічних бактерій у пацієнтів зі СпА. У дослідженні Syrbe U. і співавт. було виявлено більшу частоту виявлення *E. coli* специфічних Th1-клітин в СР і периферійній крові пацієнтів з АС порівняно з пацієнтами з РА [104]. У пацієнтів з ЕПА була знайдена антиген-специфічна проліферативна реакція мононуклеарних клітин СР (МКСР) та мононуклеарних клітин периферійної крові з білком зовнішньої мембрани (БЗМ) *Salmonella typhimurium* [98].

Порушена Th1-відповідь, що характеризується зниженням продукції інтерферону- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) та IL-2, знайдена в периферичній крові, синовії та слизовій оболонці кишечника пацієнтів, які не мають СпА, відновлення цього процесу спостерігалось після терапії антифактор некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), що свідчить про те, що хронічна експозиція TNF може бути причиною цього порушення [14].

Крім того, слід зазначити, що HLA-B27 може сприяти патогенезу СпА через запуск вродженого імунітету. Для цього запропоновано дві гіпотези: HLA-B27 може утворювати димери важкого ланцюга, які активують рецептори NK-типу [5]. По-друге, HLA-B27, змінюючись в ендоплазматичному ретикулумі, активізує реакцію неструктурованих білків (РНБ), що призводить до прозапальної реакції (тобто секреції IL-23) [24].

Є також дані про те, що HLA-B27 впливає на функцію ДК і макрофагів. Наприклад, аномальна активність ДК, у тому числі переважна індукція Th17-клітин, була показана у ДК, отриманих з трансгенних HLA-B27 шурів [47]. Підвищена внутрішньоклітинна реплікація/порушена елімінація *Salmonella enteritidis* спостерігалась в HLA-B27-трансфектованих моноцитах шляхом модуляції генів *Salmonella* [45]. Це дозволяє припустити, що HLA-B27 може сприяти захворюванню шляхом збільшення транслокації певних кишкових бактерій.

### IL-23-рецептори (IL-23R)

IL-17/IL-23 імунні шляхи є найважливішими факторами патогенезу СпА, про що свідчить посилення експресії IL-23 та IL-17 у суглобах при СпА та ефективність терапії антагоністами IL-17 або IL-23 рецепторів. Більш того, певний поліморфізм гена IL-23R пов'язаний зі СпА, псоріазом та ЗЗК [62, 80]. Кишковий IL-23 виробляється макрофагами, ДС, клітинами Панета та епітеліальними клітинами у відповідь на мікробні розлади або після активації РНБ. IL-23 підтримує виживання Th17-ефекторних клітин, стимулюючи експресію ними IL-17 і IL-22, та інгібує диференціювання до Т-регуляторних (Tregs) клітин [44].

Крім Th17-клітин IL-23R експресується багатьма клітинами імунної системи, наприклад ІЛС3,  $\gamma\delta$ -Т-клітинами та асоційованими зі слизовою оболонкою інваріантними Т-клітинами, окрім того, їм усім притаманна секреція і експресія IL-17 та ROR $\gamma$ t [110]. Продемонстровано, що експресія IL-23 ДК провокується *Chlamydia trachomatis* та іншими РеА-асоційованими мікроорганізмами [49].

### Імунорегуляція

Tregs у кишечнику відіграють вирішальне значення в протидії запальним реакціям у відповідь

на коменсальні бактерії. Tregs пригнічують запалення, виробляючи IL-10, перетворюючи тромбоцитарний фактор росту- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) і експресуючи цитотоксичний Т-лімфоцитарний антиген-4 (CTLA-4). Вони також індують В-клітини до продукування IgA-антитіл проти коменсальних мікроорганізмів [21, 28].

Зміни концентрації Tregs-клітин були виявлені у СР хворих на СпА: у пацієнтів з периферійним варіантом СпА порівняно з пацієнтами з АС та РА було виявлено збільшену кількість Tregs-клітин [6]. Збільшення продукції IL-10 Tregs-клітинами було встановлено в клубовій кишці пацієнтів з АС з хронічним запаленням кишечника [23]. Деякій генетичний поліморфізм, пов'язаний зі СпА, може впливати на функцію Tregs. Наприклад, поліморфізм STAT3 (сигнальний білок і активатор транскрипції-3) пов'язаний як з ЗЗК, так і з АС [32]. Активація STAT3 IL-6 та IL-23 у поєднанні з IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  та ROR $\gamma$ t асоціюється з утворенням Th17, що є асоційованим з ЗЗК процесом [22].

### Мікробні фактори, що впливають на стан імунної системи при СпА

Дані експериментальних досліджень надали нам уявлення про те, як кишкові мікроорганізми або їх метаболіти можуть впливати на шлунково-кишкову та імунну систему.

Як зазначалося вище, IL-17/IL-23 відіграють важливу роль у розвитку СпА. Показано, що СНБ індують диференціювання Th17-клітин, стимулюючи ДК до продукування IL-23 та IL-6 [54]. Індол-3-альдегід, метаболіт триптофану, виділяючись певною мікробіотою, наприклад, *Lactobacillus*, може спричинювати експресію IL-22, IL-17 у ВЛК [120], що, в свою чергу, обмежує експансію СНБ, інгібуючи розвиток Th17-клітини [113].

Колонізація *Clostridia* у шурів (кластери IV та XIVa) індуює розвиток Tregs-клітин, підвищує концентрацію в крові TGF- $\beta$  [12]. Полісахарид А, який експресується *Bacteroides fragilis*, також модулює ДК щодо індукції Tregs [84]. З іншого боку, певні види *Bacteroides* спричинюють хронічний коліт і артрит у трансгенних HLA-B27 шурів [81].

Збільшення концентрації сульфат-редуючих бактерій було описано у зразках фекалій пацієнтів з АС (див. вище [101]). Ці бактерії утворюють сірководень (H<sub>2</sub>S) як побічний продукт, що може порушувати епітеліальний бар'єр. Клініко-патогенетичні асоціації між цими бактеріями та ЗЗК широко відомі.

Коротколанцюгові жирні кислоти (КЖК), такі як бутират, виробляються кількома коменсальними бактеріями (наприклад, *Bacteroides*, *Clostridia* spp. тощо) у результаті вуглеводного бродіння. Вони є важливим джерелом живлення для ентероцитів та мають імуномодулюючі властивості. Показано, що низькі дози бутирату покращують епітеліальну бар'єрну функцію, тоді як високі його дози підвищують проникність кишечника за рахунок апоптозу епітеліальних клітин [76].

КЖК індують диференціацію кишкових Tregs-клітин у мишей, принаймні частково, шляхом стимуляції вироблення IL-10 та продукції ретиноевої кислоти кишковими ДК та макрофагами [43]. Доведено, що бутират знижує прозапальну експресію цитокінів *in vitro* в мононуклеарних клітинах слизової оболонки кишечника [91]. Зниження бутират-продукуючих бактерій описано як при ЗЗК, так

і в пацієнтів з ЕРА [53, 102]. На рисунку 2 узагальнено взаємодію кишкових мікроорганізмів та кишкових імунних клітин, які, як вважають, відіграють провідну роль у патогенезі СпА.

### Міграція бактеріальних антигенів з кишечника до суглобів

Точні механізми взаємозв'язку запалення кишечника та суглобів при СпА досі не з'ясовані. Одна гіпотеза полягає в тому, що кишкові бактерії або їх фрагменти рухаються до суглобів і спричинюють запалення локально. Докази, що підтверджують цю гіпотезу, переважно були знайдені при РеА. Дійсно, антигени або нуклеїнові кислоти РеА-асоційованих мікроорганізмів, а також Т-клітин, специфічних для цих бактерій, постійно виявляють у СР хворих на РеА [59]. Більше прямих доказів було отримано з виявлення експансії ідентичних Т-клітин у товстій кишці та синовії пацієнтів з ентерогенним РеА [65]. Крім того, патерни шкірних або кишкових коменсалів також були знайдені у СР пацієнтів з РеА [65].

Альтернативною гіпотезою є така, що бактеріальні антигени первинних кишкових Т-клітин і макрофагів переміщуються до суглобів, можливо, через аберантну експресію адгезивних молекул, аномальну неоваскуляризацію або локальні фактори всередині синовію. У суглобових лімфоцитах може бути повторно активоване перехресне реагування з самопептидами (такими як сам HLA-B27, з урахуванням спільних амінокислотних послідовностей з грамнегативними бактеріями). Лейкоцити кишечника, насправді, мають здатність взаємодіяти з синовіальними судинами і потрапляти до суглоба [87]. Крім того, Th17-клітини, отримані з кишечника, були знайдені в селезінці К/ВхN TCR-трансгенних мишей на початку їх генетично визначеного артриту, а вміст цих клітин корелював з титром автоантитіл. Отже, це дослідження продемонструвало зв'язок між кишковим пулом Th17, індукованим кишковою мікробіотою, та розвитком артриту. Необхідно акцентувати, що еміграція клітин Th17 була мінімальною з кишки мишей без артриту [69].

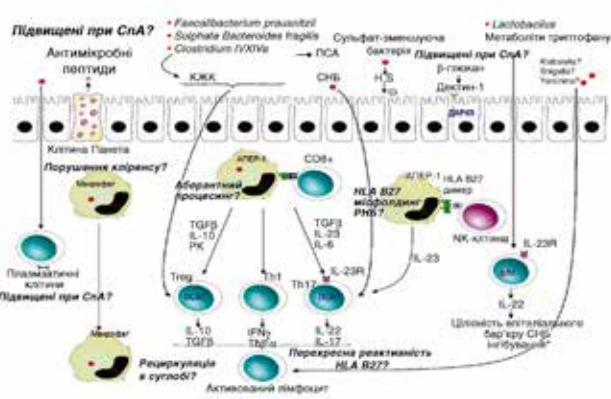
Альтернативно (або одночасно) аберантна взаємодія запалення кишки з кишковими бактеріями може призвести до посилення системного запалення, що в кінцевому підсумку може вплинути на суглоби або ентези, свідчивши про гіперреактивність до запальних стимулів через генетичні характеристики СпА. Механізм патогенезу СпА та кишкового запалення, роль мікробіоти наведені на рисунку 3.

Генетична схильність спричинює гіперреактивність до гострих тригерів у певних місцях, таких як кишечник (бактеріальний стрес) або ентези/суглоби (механічний стрес). Ця гіперреактивність призводить до активації вродженого та адаптивного імунітетів з поляризацією Th1/Th17. У кишечнику спостерігається зміна чутливості до коменсальних бактерій, наприклад, зміна визнання/процесингу, порушення кліренсу, посилення протизапальної реакції тощо. Характеристики імунної системи «господаря» (PRR, МНС-білки) та/або фактори навколишнього середовища можуть зумовлювати кишковий дисбактеріоз. Навпаки, кишкові мікроорганізми впливають на розвиток і активацію імунної системи; отже дисбактеріоз може виникати внаслідок запалення кишечника.

З іншого боку, запалення слизової оболонки саме по собі може змінити мікробіоту кишечника, відтак, важко з'ясувати, який процес відбувається першим. Втрата цілісності епітеліального бар'єра та підвищена проникність у результаті пошкодження слизової оболонки ще більше підвищує вплив і відповідь на слизові бактерії. Постійні гострі ураження/дефіцит імунної регуляції/недостатності до відновлення нормальної екосистеми кишечника призводять до хронічного системного запалення.

### Можливі терапевтичні підходи, націлені на мікробіом

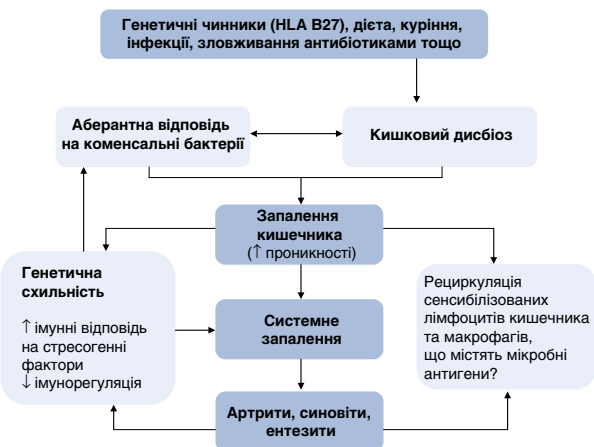
Якщо мікробіом бере участь у патогенезі та прогресуванні СпА, то якими підходами до терапії ми можемо користуватися для досягнення цільової мікробіоти кишечника? Відомо, що **антибіотики** змінюють склад мікрофлори кишечника. Є спостереження, що ураження суглобів у хворих на АС можна пом'якшити за допомогою сульфасалазину, який



**Рис. 2. Взаємодія між кишковими мікроорганізмами та кишковими імунними клітинами, які відіграють патогенетичну роль у патогенезі СпА.**

Зроблені основні гіпотези щодо розвитку СпА з урахуванням наявності HLA-B27: представлення артритогенного пептиду CD8+ Т-клітинам, порушення фолдингу білка в ЕР, що спричинює ЕР-стрес і реакцію незвернутих білків, та/або визнання димерів важкого ланцюга HLA-B27 за допомогою NK-рецепторів.

**Примітки.** H<sub>2</sub>S – сірководень, АПЕР – амінопептидаза ендоплазматичного ретикулуму, ВЛК – вроджені лімфоїдні клітини, ДАРК – домен активації і рекрутування каспаз, ЕР – ендоплазматичний ретикулум, КЖК – коротколанцюгові жирні кислоти, ПСА – полісахарид А, ПСАТ – переносники сигналу і активатори транскрипції STAT, РК – ретиноїдна кислота, РНБ – реакція незвернутих білків, UPR, СНБ – сегментовані ниткоподібні бактерії.



**Рис. 3. Гіпотетична модель патогенезу спондилоартритів, що охоплює запалення кишечника та його мікробіоту**

містить антибіотик – сульфамід [57, 68]. Зміни мікробіоти кишечника можуть бути одним з механізмів, за допомогою якого сульфасалазин проявляє ефективність при цьому захворюванні.

Грамнегативні бактерії – *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* і *Campylobacter* – є доведено задокументованими тригерами РеА, захворювання, яке клінічно збігає з АС [3]. Існує декілька повідомлень, що засвідчили зв'язок між певними грамнегативними бактеріями, такими як *Klebsiella*, та СпА [79]. У дослідженні було виявлено, що моксифлоксацин – фторхінолон, ефективний щодо грамнегативних і грампозитивних мікробів, зменшує запальні маркери та поліпшує симптоми артриту у пацієнтів зі СпА [74].

**Дієта**, як відомо, значно впливає на мікробіом кишечника. HLA-B27 трансгенні щури, яких годували пребіотичною комбінацією інуліну та олігофруктози, мали клінічно менш виражений коліт [52]. Інше дослідження показало, що споживання яблук, багатих на поліфеноли, трансгенними HLA-B27 щурами призвело до зниження виразності коліту та зниження рівня прозапальних цитокінів [20]. Миші, яких годували *Chrysanthemum indicum*, демонстрували зниження рівнів запальних медіаторів у моделях з АС [37]. Пробиотичні бактерії довели свої захисні властивості в експериментальних моделях коліту, зокрема у трансгенних щурів HLA-B27 (*Lactobacillus rhamnosus GG*) [73].

Було також доведено, що метаболіти КЖК, отриманих з клітковини, можуть зменшити СпА-асоційоване запалення кишечника та увійти в експериментальних тваринних моделях [10, 72]. Як вже згадувалося раніше, деякі кишкові бактерії зменшують запальну реакцію в моделях тварин на СпА [36].

**Пробиотики та трансплантація фекальної мікробіоти (ТФМ)** можуть бути варіантами зміни мікробіому, що призводить до зменшення активності захворювання. Пробиотики сприятливо впливають на мікрофлору кишечника, що було продемонстровано в пілотному дослідженні, в якому розглядали вплив *Lactobacillus acidophilus* та *Lactobacillus salivar* у пацієнтів з активним СпА [88].

**Пребіотики**, що містять довголанцюгові інулін та олігофруктозу, одержані з цикорію, зменшували частоту колітів і запобігали розвитку артриту у трансгенній моделі щурів HLA-B27. Цей сприятливий ефект був пов'язаний зі змінами в мікробіоті кишечника (збільшення кількості ендogenous бифідобактерій та лактобактерій), а також зниженням концентрації прозапальних цитокінів та підвищенням вмісту імунорегуляторних цитокінів [52]. Було відзначено зниження активності за шкалою BASDAI у пацієнтів, які отримували терапію пробіотиками. Ці дані були спростовані при проведенні рандомізованого контрольованого дослідження у 63 пацієнтів з високою активністю СпА, які отримували впродовж 12 тиж пероральний курс пробіотиків, що містили *Streptococcus salivarius*, *Bifidobacterium lactis* та *Lactobacillus acidophilus*: не було продемонстровано переваги порівняно з плацебо [55]. Аналогічно, у педіатричному дослідженні пацієнтів з ЕРА не вдалося визначити будь-які переваги пробіотиків [96]. З іншого боку, ці інтервенції при СпА ще не налагоджені щодо визначення необхідного складу та функції мікробіоти. Можливо, якщо пре/пробиотичні втручання стануть більш специфічними і будуть здатні заповнити

специфічні (бактеріальні/функціональні) ніші, терапевтичний ефект цих агентів буде цільовим та високоефективним.

Трансплантація фекальної мікрофлори (ТФМ), як повідомляється, є ефективною формою лікування *C. difficile*-пов'язаного псевдомембранозного коліту [70]. Дійсно, за винятком схваленого використання ТФМ для рецидивного інфікування *C. difficile*, немає консенсусного погляду щодо ефективності ТФМ для інших станів, у тому числі ЗЗК. Можливо, більш привабливою альтернативою ТФМ є «синтетичні фекалії», які наразі розробляються і містять основні види бактерій, отриманих з калу здорових людей [118].

Дотепер не проводилося жодних досліджень, що стосуються ТФМ у пацієнтів зі СпА чи СпА на тваринних моделях. Існує безліч незрозумілих питань, що стосуються ТФМ як способу лікування АС, ЗЗК або пов'язаних з ним запальних захворювань [13].

Наприклад, яким донорам надати перевагу порівняно з іншими? Який оптимальний шлях доставки фекальної мікрофлори – оральний або ректальний? Чи можливо покращання доставки препаратів за допомогою покриття капсули, що збільшує збереженість активної речовини? Як часто треба повторювати ТФМ та наскільки тривалою є терапевтична відповідь?

Таким чином, в літературі є достатньо доказів того, що СпА є мікробіом-обумовленою хворобою. Багато досліджень у цей час спрямовані на з'ясування точних механізмів того, як мікробіом кишечника впливає на етіопатогенетичні побудови СпА. Можна припустити, що мікробіом може бути ефективним способом лікування СпА у майбутньому. Швидкий темп технічних інновацій сприятиме не лише ідентифікації окремих мікроорганізмів в межах мікробіому, а й дасть нові уявлення про патомеханізми цього запального захворювання.

На додаток до цих міркувань, профілактика може бути кращою стратегією лікування. Звичайно, генетичні та сімейні дослідження можуть допомогти ідентифікувати пацієнтів з високим ризиком розвитку СпА. Якщо дійсно можна визначити бактеріальні види, що спричиняють СпА або захищають від СпА, визначення осіб високого ризику може бути гарною стратегією у майбутньому.

## Список літератури

1. Abraham C. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease / C. Abraham, R. Medzhitov // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 140, N6. – P. 1729–37.
2. Adam R. TLR4 mutations (Asp299Gly and Thr399Ile) are not associated with ankylosing spondylitis / R. Adam, R.D. Sturrock, J.A. Gracie // *Ann Rheum Dis*. – 2006. – Vol. 65, N8. – P. 1099–101.
3. Ajene A.N. Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *salmonella* and *Shigella*- associated reactive arthritis / A.N. Ajene, C.L. Fischer Walker, R.E. Black // *J Health Popul Nutr*. – 2013. – Vol. 31. – P. 299–307.
4. Novel HLA-B27-restricted epitopes from *Chlamydia trachomatis* generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis / C. Alvarez-Navarro, J.J. Cragnolini, H.G. Dos Santos, et al. // *J Biol Chem*. – 2013. – Vol. 288, N36. – P. 25810–25.
5. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? / C. Armbars, N. Yeremenko, P.P. Tak, D. Baeten // *Curr Opin Rheumatol*. – 2012. – Vol. 24, N4. – P. 351–8.
6. Synovial and peripheral blood CD4+FoxP3+ T cells in spondyloarthritis / H. Appel, P. Wu, R. Scheer, et al. // *J Rheumatol*. – 2011. – Vol. 38, N11. – P. 2445–51.
7. The role of the gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis / M. Asquith, D. Elewaut, P. Lin, J.T. Rosenbaum // *Best Pract Res Clin Rheumatol*. – 2014. – Vol. 28, N5. – P. 687–702.
8. The interaction between host genetics and the microbiome in the pathogenesis of spondyloarthropathies / M. Asquith, J.T. Rosenbaum // *Curr Opin Rheumatol*. – 2016. – Vol. 28. – P. 405–412.
9. Perturbed mucosal immunity and dysbiosis accompany clinical disease in a rat model of spondyloarthritis / M. Asquith, P. Stauffer, S. Davin, et al. // *Arthritis Rheumatol*. – 2016. – Vol. 68, N9. – P. 2151–62.
10. Intestinal metabolites are profoundly altered in the context of HLA-B27 expression and functionally modulate disease in a rat model of spondyloarthritis / M. Asquith, S. Davin, P. Stauffer, et al. // *Arthritis Rheumatol*. – 2017. – Vol. 69. – P. 1984–1995.
11. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis / P. Atagunduz, H. Appel, W. Kuon, et al. // *Arthritis Rheum*. – 2005. – Vol. 52, N3. – P. 892–901.
12. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species / K. Atarashi, T. Tanoue, T. Shima, et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 331, N6015. – P. 337–41.
13. Methods and reporting studies assessing fecal microbiota transplantation: a systematic review / A. Bafeta, A. Yavchitz, C. Riveros, et al. // *Ann Intern Med*. – 2017. – Vol. 167. – P. 34–39.
14. Impaired Th1 cytokine production in spondyloarthropathy is restored by anti-TNFalpha / D. Baeten, N. Van Damme, F. Van den Bosch, et al. // *Ann Rheum Dis*. – 2001. – Vol. 60, N8. – P. 750–5.





104. Differential synovial Th1 cell reactivity towards Escherichia coli antigens in patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis / U. Syrbe, R. Scheer, P. Wu, J. Sieper // *Ann Rheum Dis.* – 2012. – Vol.71, N9. – P. 1573–6.
105. Tannock G.W. The bowel microbiota and inflammatory bowel diseases / G.W. Tannock // *Int J Inflamm.* – 2010. – Vol.2010. – P. 954051.
106. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats / J.D. Taurog, J.A. Richardson, J.T. Croft, et al. // *J Exp Med.* – 1994. – Vol.180, N6. – P. 2359–64.
107. Analysis of the antigen-specific T cell response in reactive arthritis by flow cytometry / A. Thiel, P. Wu, R. Lauster, et al. // *Arthritis Rheum.* – 2000. – Vol.43, N12. – P. 2834–44.
108. Dialister as microbial marker of disease activity in spondyloarthritis / R.Y. Tito, H. Cyfers, M. Joossens, Varkas G, et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2016. – Vol.69, N1. – P. 114–21.
109. Brief report: dialister as a microbial marker of disease activity in spondyloarthritis / R.Y. Tito, H. Cyfers, M. Joossens, et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2017. – Vol.69. – P. 114–121.
110. Treiner E. Mucosal-associated invariant T cells in inflammatory bowel diseases: bystanders, defenders, or offenders? / E. 1 // *Front Immunol.* – 2015. – Vol.6. – P. 27.
111. Tse S.M. New advances in juvenile spondyloarthritis / S.M. Tse, R.M. // *Laxer Nat Rev Rheumatol.* – 2012. – Vol.8. – P. 269–279.
112. Qian B.F. Aberrant innate immune responses in TLR-ligand activated HLA-B27 transgenic rat cells / B.F. Qian, S.L. Tonkonogy, R.B. Sartor // *Inflamm Bowel Dis.* – 2008. – Vol.14, N10. – P. 1358–65.
113. Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora / J. Qiu, X. Guo, Z.M. Chen, et al. // *Immunity.* – 2013. – Vol.39, N2. – P. 386–99.
114. Comorbidities in patients with spondyloarthritis / I.E. van der Horst-Bruinsma, M.T. Nurmohamed, R.B. Landewe // *Rheum Dis Clin North Am.* – 2012. – Vol.38. – P. 523–538.
115. Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model / L. Van Praet, F.E. Van den Bosch, P. Jacques, et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2013. – Vol.72. – P. 414–417.
116. Degree of bone marrow edema in sacroiliac joints of patients with axial spondyloarthritis is linked to gut inflammation and male sex: results from the GIANT cohort / L. Van Praet, L. Jans, P. Carron, et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2014. – Vol.73, N6. – P. 1186–9.
117. Walker A.W. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota / A.W. Walker // *ISME J.* – 2011. – N5. – P. 220–230.
118. Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease / Z.K. Wang, Y.S. Yang, Y. Chen, et al. // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol.20, N40. – P. 14805–20.
119. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells / H.J. Wu, I.I. Ivanov, J. Darce, et al. // *Immunity.* – 2010. – Vol.32. – P. 815–827.
120. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via Interleukin-22 / T. Zelante, R.G. Iannitti, C. Cunha, et al. // *Immunity.* – 2013. – Vol.39, N2. – P. 372–85.
121. Zeng L. Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response / L. Zeng, M.J. Lindstrom, J.A. Smith // *Arthritis Rheum.* – 2011. – Vol.63, N12. – P. 3807–17.

## РОЛЬ МІКРОБІОМА ПРИ СПОНДИЛОАРТРИТАХ. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ФЕКАЛЬНОЇ МІКРОБІОТИ ПРИ СПОНДИЛОАРТРИТАХ ГОТОВА К КЛІНІЧЕСКИМ ІСПЫТАННЯМ?

И.Ю. Головач<sup>1</sup>, Е.Д. Егудина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Клінічна лікарня «Феофанія» Государственного управления делами, г. Киев

<sup>2</sup> ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия» МЗ Украины

### Резюме

Растет понимание механизмов воздействия микробиоты за пределами ее первичной локализации (слизистой оболочки кишечника) на другие органы и системы. Бактерии, присутствующие в кишечнике, значительно влияют на иммунную систему «хозяина» как на местном, так и на отдаленном уровне. Как известно, микробиом кишечника играет определенную роль в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника. Существует много общих клинических проявлений между воспалительными заболеваниями кишечника и спондилоартритом. Клинический оверлап вместе с подобной генетикой между этими заболеваниями предусматривает возможный общий патогенетический механизм, который, вероятно, обусловлен состоянием микробиоты кишечника. В данном обзоре рассмотрены доказательства, подтверждающие роль микробиома в этиологии и патогенезе спондилоартрита. Кроме того, обговариваются разные парадигмы лечения, направленные на микробиоту кишечника при спондилоартрите.

**Ключевые слова:** микробиом, анкилозирующий спондилит, спондилоартрит, HLA-B27, патогенез, трансплантация фекальной микробиоты.

## THE ROLE OF THE MICROBIOME IN SPONDYLOARTHRITIS. FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION IN SPONDYLOARTHRITIS: READY FOR A CLINICAL TRIAL?

I.Yu. Golovach<sup>1</sup>, Ye.D. Yehudina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> «Feofaniya» Clinical Hospital State Management of Affairs, Kyiv

<sup>2</sup> SE «Dnipropetrovsk Medical Academy» of the Ministry of Health of Ukraine

### Abstract

There is a growing understanding of the mechanisms by which the influence of the microbiota projects beyond sites of primary mucosal occupation to other human body systems. Bacteria present in the intestinal tract exert a profound effect on the host immune system, both locally and at distant sites. The intestinal microbiome is thought to play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. There are many shared clinical manifestations between inflammatory bowel disease and spondyloarthritis. Clinical overlap along with similar genetics between these diseases suggests a possible shared pathogenetic mechanism, which might center on the intestinal microbiota. In this review evidence which supports a role of the microbiome in the aetiology and pathogenesis of spondyloarthritis is examined. In addition, different treatment paradigms targeting the intestinal microbiome for spondyloarthritis are discussed.

**Key words:** microbiome, ankylosing spondylitis, spondyloarthritis, HLA-B27, pathogenesis, fecal microbiota transplantation.

## Вельмишановні колеги!

Харківський національний медичний університет, кафедри пропедевтики педіатрії №2, пропедевтики внутрішньої медицини №2 та медсестринства, а також внутрішньої медицини №2 і клінічної імунології та алергології запрошують вас взяти участь у роботі традиційної Всеукраїнської науково-практичної конференції алергологів Слобожанщини на тему:

### «Актуальні питання виявлення і лікування алергічних захворювань»,

яка відбудеться

**12 квітня 2019 р. в м. Харків**

Робота конференції проводитиметься у вигляді доповідей, міні-лекцій провідних фахівців з алергології та імунології, майстер-класів, дискусій.

Відповідно до наказу МОЗ України від 07.07.2009 №484 «Про затвердження Змін до Положення про проведення іспитів на передатестаційних циклах», зареєстрованого в Міністерстві юстиції України від 27.07.2009 за № 693/16709, лікар отримує: за участь у роботі конференції – 2 бали, публікацію тез – 3 бали, статті – 10 балів (одноосібна) або 5 балів (у співавторстві).

**Місце проведення заходу:** м. Харків, 61022, пр. Науки, 4, актові зала.

**Реєстрація учасників:** 12 квітня 2019 р. з 8.00.

- За результатами конференції буде видано збірник матеріалів конференції.

**Форми участі в конференції:** усна доповідь і публікація тез/статті:

- стендова доповідь і публікація тез/статті;
- публікація тез/статті.

**Робочі мови конференції:** українська, російська, англійська.

**За довідками звертатись:**

тел.: +38 (067) 949-22-46 – *Клименко Вікторія Анатоліївна*

тел.: +38 (050) 716-53-69 – *Бездітко Тетяна Василівна*

тел.: +38 (067) 573-23-38 – *Бабаджан Володимир Данилович*

тел.: +38 (067) 785-13-52 – *Карпушенко Юлія Валентинівна*

тел./факс: +38 (057) 725-10-38; e-mail: ppn2-khnmu@ukr.net.

**Адреса оргкомітету:** вул. Клочківська, 337а, м. Харків.

КЗОЗ «Обласна дитяча клінічна лікарня № 1», кафедра пропедевтики педіатрії № 2.

**Медіапартнер – журнал «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія»**

## Шановні колеги!

Запрошуємо вас до участі у науково-практичній конференції на тему:

### «Клініко-епідеміологічні особливості дерматозів та інфекцій, що передаються статевим шляхом, у сучасний період. Інноваційні методи діагностики і терапії в дерматовенерології»,

яка відбудеться **18 квітня 2019 р. у м. Київ**

в рамках Х Ювілейного Міжнародного медичного форуму. Конференцію внесено до «Реєстру з'їздів, конгресів, симпозіумів та науково-практичних конференцій, що проводитимуться у 2019 р.».

**Програмні питання заходу:**

- Сучасні методи діагностики та терапії інфекційних шкірних захворювань, інфекцій, що передаються статевим шляхом, та тяжких дерматозів в Україні.
- Питання дитячої дерматовенерології, психодерматології та дерматоонкології.
- Вплив міграційних процесів на поширення інфекційних дерматозів, хвороб, що передаються статевим шляхом, та запобігання їх поширенню.

**Місце проведення:** ТОВ «Міжнародний виставковий центр», м. Київ, Броварський проспект, 15 (метро «Лівобережна»).

**Реєстрація:** 18 квітня 2019 р. з 13:00 до 15:00, безкоштовно.

Також можлива попередня реєстрація за посиланням <http://medforum.in.ua>

**Медіапартнер – журнал «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія»**

ГОЛОВНІ ПОДІЇ У ГАЛУЗІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

10 РОКІВ  
РАЗОМ  
iMF

X ЮВІЛЕЙНИЙ МІЖНАРОДНИЙ  
МЕДИЧНИЙ ФОРУМ

ІННОВАЦІЇ В МЕДИЦИНІ – ЗДОРОВ'Я НАЦІЇ



VIII МІЖНАРОДНИЙ МЕДИЧНИЙ КОНГРЕС

ВПРОВАДЖЕННЯ СУЧАСНИХ ДОСЯГНЕНЬ МЕДИЧНОЇ НАУКИ У ПРАКТИКУ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ



IV МІЖНАРОДНИЙ ФОРУМ  
МЕНЕДЖМЕНТ В ОХОРОНІ ЗДОРОВ'Я

За підтримки:



Президента України



Кабінету Міністрів  
України



Офіційна підтримка:

Міністерства охорони  
здоров'я України



Київської міської  
державної адміністрації

Генеральний  
партнер:

Сапос

Під патронатом:



Комітету Верховної Ради України  
з питань охорони здоров'я



Національна академія  
медичних наук України



Організатори:

НМАПО імені  
П. Л. Шупика



Компанія LMT

Офіційний  
партнер:



17-19 квітня  
2019 року

КРАЇН << 35 65 >> НАУКОВИХ ЗАХОДІВ

ЕКСПОНЕНТІВ << 400 800 >> ДОПОВІДАЧІВ

ВІДВІДУВАЧІВ << 15000 100 >> ЛІКАРСЬКИХ  
СПЕЦІАЛЬНОСТЕЙ

УВАГА! НОВЕ МІСЦЕ  
ПРОВЕДЕННЯ ФОРУМУ



Міжнародний Виставковий Центр  
м. Київ, Броварський пр-т, 15  
станція метро «Лівобережна»

MEDICAEXPO Міжнародна виставка охорони здоров'я

PHARMAEXPO Міжнародна фармацевтична виставка

✓ **Весь спектр обладнання, техніки, інструментарію  
для медицини, новинки фармацевтичних препаратів  
від світових та вітчизняних виробників**

✓ **Науково-практичні заходи**

✓ **Школи та майстер-класи на діючому обладнанні**

З питань участі у виставках:

+380 (44) 206-10-16

@ med@lmt.kiev.ua



З питань участі у Конгресі:

+380 (44) 206-10-99

@ info@medforum.in.ua

WWW.MEDFORUM.IN.UA

WWW.HCM.IN.UA

## ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ ТА АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ АЛЕРГОЛОГІЇ

DoctorThinking #Happy2Allergic MeetUp

Вінниця, 17 квітня 2019 року



### Науково-практична конференція! Основні напрями роботи

- Діагностика та лікування алергічних захворювань у дітей та дорослих (атопічний дерматит, кропив'янки, алергічний риніт та бронхіальна астма);
- Сучасні підходи до медикаментозної алергії, – харчова алергія;
- Діагностика та терапія невідкладних станів в алергології (анафілаксія, ангіоневротичний набряк);
- Молекулярна алергодіагностика;
- Алерген-специфічна імунотерапія;
- Раціональна фармакотерапія алергічних захворювань у дітей та дорослих;
- Про- та пребіотична терапія; антибіотикотерапія.

### DoctorThinking MeetUp: #Happy2Allergic!

Це мультидисциплінарний, дискусійний формат, практично орієнтовані кейси, майстер-класи, інтерактивні сесії, прями трансляції, дружня атмосфера «БутиДобру!»

### До участі в конференції запрошуються:

- лікарі алергологи (дорослі та дитячі);
- пульмонологи, лікарі-лаборанти;
- педіатри, терапевти та сімейні лікарі;
- дерматологи, отоларингологи, стоматологи;
- урологи, анестезіологи-реаніматологи.

Мотивовані лікарі-інтерни, клінічні ординатори, молоді науковці – welcome!

**Місце проведення:** Вінниця, вулиця Архітектора Артинова, 12а, зупинки транспорту, – «Майдан Незалежності». «Вулиця Театральна»

Конференц-зали Галереї XXI (ІнтерШик) – 4 та 5 поверхи

**Медіапартнер – журнал «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія»**

## Шановні колеги!

Українська військово-медична академія, ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», кафедра дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, кафедра інфекційних хвороб Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, Національний військово-медичний клінічний центр «ГВКГ», Видавничий дім «Заславський» запрошують вас взяти участь у науково-практичній конференції з міжнародною участю

### «Актуальні інфекційні захворювання в практиці сімейного лікаря», яка відбудеться 4–5 квітня 2019 р. в м. Київ

#### У програмі конференції плануються такі науково-практичні напрями роботи:

- Особливості клінічних проявів, перебігу, діагностики, лікування, профілактики при:
  - вірусних та бактеріальних інфекціях;
  - гострих, хронічних вірусних гепатитах;
  - інфекційних захворюваннях травного тракту;
  - геморагічних лихоманках;
  - протозойних інфекціях, гельмінтозах;
  - рідкісних та нових інфекціях, зокрема тих, що завозяться;
  - особливо небезпечних інфекціях.
- Синдроми та симптоми інфекційних захворювань у практиці сімейного лікаря.
- Антибактеріальні, противірусні препарати.
- Імунопрофілактичні засоби.
- Профілактичні засоби, дезінфекційна та стерилізаційна апаратура.
- Діагностичне обладнання, діагностикуми.
- Внутрішньолікарняні інфекції.
- Організація надання медичної допомоги інфекційним хворим у мирний та воєнний час.
- Інфекційні захворювання у військовослужбовців.

**Офіційні мови конференції:** українська, російська, англійська.

**Місце проведення:** м. Київ, вул. Госпітальна, 18, актовий зал клубу ГВКМЦ «ГВКГ».

**Адреса оргкомітету:** Україна, 01113, Київ, вул. Госпітальна, 18, Клініка інфекційних захворювань Національного військово-медичного клінічного центру «ГВКГ» МО України.

#### Контакти

**З науково-організаційних питань:** професор кафедри Української військово-медичної академії, д-р мед. наук **Трихліб Володимир Іванович**; e-mail: v.tryhleb@gmail.com; тел.: +38 (067) 500-42-76.

**Організатор:** **Карпінський Павло Сергійович**; e-mail: pavel89karpinskiy@gmail.com, тел.: +38 (098) 210-91-02.

**Медіапартнер – журнал «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія»**



И.П. Кайдашев  
**Гиперчувствительность к лекарственным  
 препаратам. Руководство для врачей**

Год выпуска: 2016.  
 Количество страниц: 288.

Руководство посвящено актуальной проблеме современной медицины – лекарственной аллергии. В нем на современном теоретическом и клиническом уровнях рассмотрены вопросы этиологии и патогенеза гиперчувствительности к лекарственным препаратам. На основе множества литературных данных, преимущественно полученных методами доказательной медицины, описана клиническая картина медикаментозных поражений различных органов и систем организма. Рассмотрены особенности реакций гиперчувствительности на отдельные группы наиболее распространенных препаратов. Освещены современные методы диагностики реакций гиперчувствительности с особым вниманием к их применимости для использования в клинической практике. Приведены подходы к лечению и профилактике реакций гиперчувствительности на лекарственные препараты.

Руководство предназначено для врачей всех специальностей.

**Приобрести монографию можно на сайте:**  
<http://www.medkniga.kiev.ua/>

## Трихология

*Второе издание, дополненное и переработанное*

**Абрахам Златогорский, Джерри Шапиро**

Под редакцией проф. Александра Литуса  
 Перевод с английского проф. Юлии Овчаренко



В коллективном труде, созданном под редакцией ведущих мировых специалистов в дерматологии – Абрахама Златогорского (Иерусалим) и Джерри Шапиро (Нью-Йорк), рассмотрены современные аспекты диагностики и лечения заболеваний волос и волосистой части кожи головы. В лаконичном, но исчерпывающем тексте освещен чрезвычайно широкий спектр вопросов: от основ биологии волосяного фолликула и современных методов исследования волос до терапевтических подходов к лечению самых распространенных трихологических нозологий. Во втором издании нашей книги освещены передовые достижения последних лет, которые позволили лучше понять аспекты нормального функционирования различных отделов волосяного фолликула, а также прояснить патогенез многих трихопатологий, представлены инновационные методы терапии болезней волос и результаты проведения исследований эффективности известных препаратов. Особое внимание уделяется новым методам диагностики в трихологии. В большинство глав внесена обновленная информация, отражающая современные воззрения в этой области. Кроме того, к этому изданию добавлены четыре уникальных раздела, посвященных трихоскопии и трансплантации волос.

Руководство адресуется практикующим врачам, интернам и студентам.

**По вопросам приобретения и распространения книги  
 обращайтесь: [office@dermjournal.com.ua](mailto:office@dermjournal.com.ua)  
 +38 044 353 11 77, +38 095 282 66 53**

# ПЕРЕДПЛАТА

## Шановні читачі!

Передплатити наше видання Ви можете в будь-якому поштовому відділенні зв'язку «Укрпошти» чи в регіональних передплатних агентствах за каталогом у розділі «Охорона здоров'я України. Медицина».

### Журнал «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія»

Про функції імунної системи в нормі і при патології, алергійні й інфекційні захворювання

Передплатний індекс – **94977**

Періодичність виходу – **8 разів на рік**

**Вартість передплати: на рік – 640,00 грн.**

**Реквізити:** ТОВ «Медичний журнал «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія.»

вул. Механізаторів, 2, м. Київ, 03035, ЄДРПОУ 38391854.

П/р 2600 363 646 6100 в ПАТ «УкрСиббанк», МФО 351005.

**Відділ передплати:** тел.: (044) 364-40-29

E-mail: peredplata.zu@gmail.com

## Шановні читачі!

Нас цікавить Ваша думка щодо інформаційного наповнення журналу: які теми, на Ваш погляд, заслуговують на особливу увагу, яка інформація Вам необхідна для роботи. Будемо вдячні за Ваші відгуки, пропозиції та побажання. Заповнену анкету (або її ксерокопію) надсилайте за адресою:

**редакція журналу «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія»**,

**вул. Механізаторів, 2, м. Київ, 03035**, або електронною поштою: peredplata.zu@gmail.com



### Анкета читача\*

П.І.Б. ....

Місце роботи (назва медичного закладу та відділення) .....

Спеціальність ..... Посада .....

Назвіть три найкращі матеріали з цього номера й оцініть їх за 12-бальною шкалою:

1. ....

2. ....

3. ....

Які теми варто висвітлювати в наступних номерах? .....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....