

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 63



5-6'2018

Научно-практический журнал

НОВИНКА!

ЛЕЧЕНИЕ СО ВКУСОМ



teva

Инструкция по медицинскому применению препарата Хилак форте. Предназначено для специалистов здравоохранения. Не предназначено для демонстрации пациентам. За дополнительной информацией обращаться: ООО «Тева» Россия, 115054, Москва, ул. Валовая, д. 35. Тел. +7 (495) 644-22-34, факс +7 (495) 644-22-35. E-mail: info@teva.ru, www.teva.ru. HLKF-RU-00326-Pharm-HCP

Реклама

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

«Антибиотики и химиотерапия» —
ежемесячный научно-практический
журнал
Основан в 1956 году

«Antibiotics and Chemotherapy»
Issued 12 times a year
Since 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.
ГНЦА
Тел.: 8-499-611-20-77
Факс: 8-499-611-42-38
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Зав. редакцией Л. Б. Смирнова
Корректор: А. Н. Лобусева
Сайт: www.jantchem.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-499-611-20-77
Факс: 8-499-611-42-38
E-mail: gncajournal@yandex.ru
Л. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

- индекс **71404** — для индивидуальных подписчиков
- индекс **71405** — для предприятий и организаций

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

- индекс **10659** — для индивидуальных подписчиков
- индекс **10660** — для предприятий и организаций

Журнал зарегистрирован
в Комитете РФ по печати
Рег. свид. № 0110694 от 25 мая 1993 г.

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2018

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: 2018

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 63

5—6'2018

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

Главный редактор
профессор, д. м. н. Сидоренко С. В.

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.
Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.
Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Проф., д. м. н. Белобородов В. А.
Проф. Говорун В. М.
Проф. Гомберг М. А.
Д. б. н. Даниленко В. Н.
Проф. Климко Н. Н.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Хрянин А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.
к.б.н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Клясова Г. А.
Бибикова М. В.	Ленёва И. А.
Васильев А. Н.	Митрохин С. Д.
Волжанин В. М.	Романцов М. Г.
Дмитриева Н. В.	Сычев Д. А.
Долгова Г. В.	Тең В. В.
Захарова Ю. А.	Цыбанев А. А.
Зуева Л. П.	Ших Е. В.
Ильина Е. Н.	

**Журнал* цитируется в: Medline; Ind Chem;
Index Medicus; Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr;
Current Contents (Life Sciences)**

**Cited in: Medline; Ind Chem; Index Medicus;
Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr;
Current Contents (Life Sciences)**

Оригинальные статьи

Original Papers

Полудова Т. В., Ерошенко Д. В., Коробов В. П.
Биоплёнки антибиотикорезистентных
Propionibacterium acnes и их чувствительность
к антибактериальным пептидам стафилококков

3 Polyudova T. V., Eroshenko D. V., Korobov V. P.
Biofilms of Antibiotic-Resistant *Propionibacterium Acnes*
and Their Sensitivity to Antimicrobial Peptides
of Staphylococci

В помощь практикующему врачу

Guidelines for Practitioners

Соколова В. И., Сычев Д. А.,
Бабарина М. Б., Васильева Е. И.
Диабетическая стопа: возможности антибактериальной
и антиоксидантной терапии
Липатов К. В., Комарова Е. А.,
Мирская М. А., Хрупкин В. И., Кирюпина М. А.
Особенности микробного пейзажа и антимикробной
химиотерапии у больных нелактационным маститом
Казаков А. В., Можокина Г. Н., Аксенова В. А.,
Смердин С. В., Попов С. А., Клевно Н. И.,
Рагимов А. А., Кузнецов О. Е., Козлов В. В.
Влияние генетического полиморфизма генов ферментов,
ответственных за биотрансформацию
противотуберкулёзных препаратов на риск развития
гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом
Павелкина В. Ф., Ускова Ю. Г.
Эффективность реамберина в коррекции процессов
липопероксидации при гастроинтестинальной
форме сальмонеллёза
Кочеровец В. И.
Антибактериальные антибиотики и бактериальные
пробиотики: возможно ли совместить несовместимое

10 Sokolova V. I., Sychev D. A.,
Babarina M. B., Vasilyeva E. I.
Diabetic Foot: The Possibilities of Antibacterial
and Antioxidant Therapy
16 Lipatov K. V., Komarova E. A., Mirskaya M. A.,
Khrupkin V. I., Kiryupina M. A.
Features of Microbial Landscape and Antimicrobial
Chemotherapy in Patients with Non-Lactational Mastitis
20 Kazakov A. V., Mozhokina G. N., Aksenova V. A.,
Smerdin S. V., Popov S. A., Klevno N. I.,
Ragimov A. A., Kuznetsov O. E., Kozlov V. V.
Effect of Genetic Polymorphism of the Enzyme Genes
Responsible for Biotransformation
of Antituberculous Drug on the Risk
of Hepatotoxic Reaction in Patients with Tuberculosis
26 Pavelkina V. F., Uskova Yu. G.
The Efficacy of Reamberin in Correction
of Lipoperoxidation Processes
in the Gastrointestinal Form of Salmonellosis
34 Kocherovets V. I.
Antibacterial Antibiotics and Bacterial Probiotics:
Is it Possible to Combine the Incompatible

Стандартизация и контроль
лекарственных средствDrug Standardization
and Control

Шаповалова О. В., Неугодова Н. П., Сапожникова Г. А.
Выбор метода определения
бактериальных эндотоксинов
Зырянов С. К., Затолочина К. Э., Асеевская И. Л.
Левифлоксацин: анализ информации
об осложнениях фармакотерапии отечественной базы
данных спонтанных сообщений

43 Shapovalova O. V., Neugodova N. P., Sapozhnikova G. A.
Choosing Bacterial Endotoxin
Detection Method
46 Zyryanov S. K., Zatolochina K. E., Asetskaya I. L.
Levofloxacin: Analysis of Information
on Adverse Reactions from Russian Spontaneous
Report Database

Обзоры

Reviews

Беседнова Н. Н., Макаренкова И. Д., Федянина Л. Н.,
Авдеева Ж. И., Крыжановский С. П.,
Кузнецова Т. А., Запорожец Т. С.
Дезоксирибонуклеиновая кислота про- и эукариот
в профилактике и терапии инфекционных болезней

52 Besednova N. N., Makarenkova I. D., Fedyanina L. N.,
Avdeeva Zh. I., Kryzhanovsky S. P.,
Kuznetsova T. A., Zaporozhets T. S.
Prokaryotic and Eukaryotic DNA in Prevention
and Treatment of Infectious Diseases

Лекции

Lectures

Белов Б. С.
А-стрептококковые инфекции глотки:
диагностика и рациональная антибактериальная терапия

68 Belov B. S.
Group A Streptococcal Pharyngeal Infections:
Diagnosis and Rational Antibacterial Therapy

* Журнал входит в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Биоплёнки антибиотикорезистентных *Propionibacterium acnes* и их чувствительность к антибактериальным пептидам стафилококков

*Т. В. ПОЛЮДОВА^{1,2}, Д. В. ЕРОШЕНКО¹, В. П. КОРОБОВ^{1,3}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь

² Пермский государственный аграрно-технологический университет им. акад. Д. Н. Прянишникова, Пермь

³ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь

Biofilms of Antibiotic-Resistant *Propionibacterium Acnes* and Their Sensitivity to Antimicrobial Peptides of Staphylococci

*T. V. POLYUDOVA^{1,2}, D. V. EROSHENKO¹, V. P. KOROBV^{1,3}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm

² Perm State Agro-Technological University, Perm

³ Perm National Research Polytechnic University, Perm

Работа посвящена изучению биологических свойств антибиотикорезистентных бактерий *Propionibacterium acnes* и их чувствительности к антибактериальным катионным пептидам варнерину и хоминину. Селекционным путём получены устойчивые к рифампицину и тетрациклину штаммы *P. acnes* VKM Ac-1450. С помощью диско-диффузионного метода показано, что приобретение устойчивости к данным антибиотикам сопровождается снижением чувствительности бактерий к ряду других антибактериальных препаратов. В результате определения минимальных подавляющих концентраций катионных пептидов установлено, что чувствительность антибиотикоустойчивых штаммов *P. acnes* к варнерину и хоминину сохраняется на уровне чувствительности родительского штамма. Антибиотикорезистентные бактерии проявляют более выраженную способность к адгезии и биоплёнкообразованию по сравнению с бактериями родительского штамма, однако формирование биоплёнок может быть эффективно подавлено стафилококкцинами. Анализ кривых интенсивности образования биоплёнок *P. acnes* от содержания пептидов в среде позволил установить концентрации, вызывающие торможение роста биоплёнок на 50%. Несмотря на то, что полученные значения в 5–12 раз больше, чем значения МПК для планктонной культуры *P. acnes*, стафилококкцины представляют собой перспективные препараты для борьбы с инфекциями, вызванными пропионовыми бактериями.

Ключевые слова: *Propionibacterium acnes*, антибиотикорезистентность, рифампицин, тетрациклин, биоплёнки, адгезия, антибактериальные пептиды, стафилококкцины.

The article is devoted to the study of biological properties of antibiotic-resistant bacteria *Propionibacterium acnes* and their sensitivity to antibacterial cationic peptides varnerin and hominin. *P. acnes* Ac-1450 strain resistant to rifampicin and tetracycline were obtained by selection. With the help of the Kirby-Bauer disk diffusion test, it is shown that the acquisition of resistance to these antibiotics is accompanied by a decrease in the sensitivity of bacteria to a number of other antibacterial drugs. As a result of the determination of the minimum inhibitory concentrations of cationic peptides, it has been established that the sensitivity of antibiotic-resistant *P. acnes* strains to varnerin and hominin is maintained at the sensitivity level of the parent strain. Antibiotic-resistant bacteria show a more pronounced ability for adhesion and biofilm formation in comparison with the bacteria of the parent strain, however, the formation of biofilms can be effectively suppressed by staphylococins. Analysis of the curves of the formation intensity of *P. acnes* biofilms, depending on the content of peptides in the medium, made it possible to establish concentrations that inhibit the growth of biofilms by 50%. Despite the fact that the values obtained were 5–12 times higher than the MIC values for planktonic culture of *P. acnes*, staphylococins are promising drugs for combating infections caused by propionic bacteria.

Keywords: *Propionibacterium acnes*, antibiotic resistance, rifampicin, tetracycline, biofilms, adhesion, antibacterial peptides, staphylococins.

Введение

Микробно-воспалительные заболевания являются одной из острых проблем практического

здравоохранения. Существование подобной ситуации обусловлено многими факторами, среди которых ведущими являются быстрый рост и распространение устойчивой к антибиотикам условно-патогенной микрофлоры [1, 2] и снижение иммунологической резистентности макроорганизма [3]. Высокий интерес исследователей к

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 614081 г. Пермь, ул. Голева, д.13. Институт экологии и генетики микроорганизмов

бактериям *Propionibacterium acnes*, в первую очередь, обусловлен их ролью в механизме возникновения угревой болезни. При снижении содержания кислорода в кожных покровах бактерии *P.acnes*, являющиеся компонентом нормальной микрофлоры, становятся более агрессивными. В этом состоянии они вызывают разрушение клеток протоков сальных желез [4]. Иммунная система реагирует на вторжение *P.acnes* локальным воспалением с образованием гнойной пустулы. В связи с выявленными механизмами развития акне, современное лечение основано на использовании антибактериальных препаратов.

Необходимо отметить появление в последнее время данных о роли бактерий *P.acnes* в имплантат-ассоциированных инфекциях, однако механизмы адгезии и формирования биоплёнок пропионовыми бактериями до сих пор не раскрыты. Также не определена и стратегия оптимальной антибактериальной терапии инфекций, вызванных *P.acnes* и связанных с использованием имплантируемых устройств [5].

Наиболее часто для лечения акне используются системные антибиотики, такие как тетрацилин, эритромицин и доксициклин, что может служить одной из причин возникновения резистентности *P.acnes* к этим препаратам [6]. В тоже время, рифампицин как самостоятельно, так и в синергизме с другими антибиотиками, эффективно используют в клинической практике для борьбы с грамположительными бактериями в составе биоплёнок, в частности, стафилококками [7]. Кроме того, показана его эффективность в лечении осложнённых имплантат-ассоциированных инфекций, вызванных *P.acnes* [5, 8].

Несмотря на огромное количество охарактеризованных низкомолекулярных катионных пептидов, выделенных как из бактерий, так и высших организмов, действие их на *P.acnes* показано лишь для некоторых дефенсинов земноводных и человека [9, 10]. Среди низкомолекулярных катионных пептидов бактерий, выраженная антимикробная активность в отношении *P.acnes* показана лишь для энтероцина из *Enterococcus faecalis* SL-5 [11]. В этой связи катионные пептиды сапрофитных стафилококков, могут стать перспективными агентами в борьбе с возбудителями угревой болезни, поскольку единство экологических ниш бактерий родов *Staphylococcus* и кожных *Propionibacterium* свидетельствует о том, что стафилококки являются естественными природными антагонистами пропионовых бактерий — обитателей кожных покровов животных и человека.

Цель работы — изучение биологических свойств антибиотикорезистентных бактерий *P.acnes* VKM Ac-1450 и их чувствительности к антибактериальным катионным пептидам варнерину и хоминину, выделенным из сред роста

Staphylococcus warneri KL-1 (DSMZ-16081) и *S.hominis* KLP-1, соответственно.

Материал и методы

Объектом исследования явился штамм бактерий *P.acnes* VKM Ac-1450 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, г. Пушкино), выделенный из фолликулярной пустулы. Для культивирования бактерий *P.acnes* использовали бульон Луриа-Бертани (LB), содержащий, г/л: триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, KCl — 6,4. Полученные культуры использовали в качестве инокулума для последующих экспериментов.

Антибиотикоустойчивые варианты штамма *P.acnes* VKM Ac-1450: *P.acnes* VKM Ac-1450 Rif^r штамм, устойчивый к рифампицину и *P.acnes* VKM Ac-1450 Tetr штамм, устойчивый к тетрациклину, были получены селекционным путём с помощью многократных пересевов клеток исходного штамма *P.acnes* VKM Ac-1450 в жидкой среде LB с возрастающими концентрациями соответствующего антибиотика в течение 5 циклов, продолжительность каждого цикла 72 ч [12]. Начальная концентрация рифампицина и тетрациклина (НИЦФ, Россия) в среде роста бактерий составляла 0,2 мкг/мл, максимальная концентрация — 20 мкг/мл.

Лекарственная устойчивость определялась диско-диффузионным методом на агаре Мюллера—Хинтон с использованием дисков (НИЦФ, Россия) в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 [13].

Адгезивные свойства бактерий оценивали по способности сорбироваться на гидрофобной поверхности полистирола (чашки Петри, 40 мм, «Медполимер», Россия) или гидрофильной поверхности покровных стекол (24×24 мм², «Минимед», Россия) во время инкубации при 37°C в течение 60 мин [14]. Количество связавшихся с поверхностью бактерий оценивали прямым подсчётом клеток в поле зрения после окрашивания их раствором кристаллического фиолетового (0,1%). Подсчёт адгезированных клеток проводили на микровизоре «µViso-103» (Россия) не менее чем в 10 полях зрения при увеличении ×1000.

Определение степени гидрофобности пропионовых бактерий проводили с помощью MATH-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) с н-гексадеканом [15].

Антибактериальные пептиды варнерин (APD ID 02801 <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) и хоминин [16] были выделены и очищены с помощью ионообменной хроматографии из сред роста *Staphylococcus warneri* KL-1 (DSMZ-16081) и *S.hominis* KLP-1, соответственно, согласно методике [17].

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) варнерина и хоминина по отношению к *P.acnes* определяли методом микроразведений в бульоне Мюллера—Хинтон (Oxoid, США), согласно рекомендациям CLSI [18].

Для оценки динамики гибели бактерий *P.acnes* в присутствии антибактериальных пептидов варнерина и хоминина суспензию клеток *P.acnes* VKM Ac-1450 в 10 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,2), содержащую 2×10⁸ КОЕ/мл, смешивали в соотношении 1:1 с растворами варнерина или хоминина (1 мг/мл) в том же буфере и инкубировали при 37°C в течение 180 мин. В контрольном варианте бактериальную суспензию смешивали 1:1 с буфером, не содержащим пептидов. Количество живых клеток определяли через 15, 30, 60, 120 и 180 мин инкубации высеваем десятичных разведений суспензий клеток *P.acnes* на плотную питательную среду с подсчётом количества выросших колоний.

Биоплёнки бактерии *P.acnes* выращивали классическим способом в 96-луночном плоскодонном полистироловом планшете (Медполимер, Россия) в среде LB с добавлением 0,5% глюкозы при 37°C в течение 48 ч. При засеве количество клеток *P.acnes* составляло ~10⁷ КОЕ/мл. Биомассу образовавшихся плёнок определяли по оптической плотности спиртовых экстрактов на планшетном спектрофотометре Benchmark plus (BioRad, США) при длине волны 570 нм (OD570) после

Таблица 1. Чувствительность бактерий *P.acnes* VKM Ac-1450 и его антибиотикоустойчивых производных к антибиотикам

Антибиотик (концентрация на диске)	Диаметр зон задержки роста бактерий, мм		
	<i>P.acnes</i> VKM Ac-1450	<i>P.acnes</i> VKM Ac-1450 Tet ^r	<i>P.acnes</i> VKM Ac-1450 Rif ^r
Бензилпенициллин (10 ЕД)	34±1,20	34±1,55	36±1,50
Цефалексин (30 мкг)	30±0,85	26±1,20	24±0,85
Ванкомицин (30 мкг)	24±0,50	26±1,22	26±0,85
Оксациллин (10 мкг)	28±0,50	18±0,56	20±0,65
Тетрациклин (30 мкг)	30±1,30	14±1,00	26±0,68
Эритромицин (15 мкг)	≥40	≥40	≥40
Фузидин (10 мкг)	≥40	≥40	≥40
Левомецетин (30 мкг)	≥40	≥40	≥40
Гентамицин (10 мкг)	24±1,00	18±0,55	12±0,55
Линкомицин (15 мкг)	22±0,55	22±0,89	24±0,85
Рифампицин (5 мкг)	34±0,92	32±1,22	0
Ципрофлоксацин (5 мкг)	28±0,88	22±1,40	26±0,64

окрашивания биоплёнок кристаллическим фиолетовым (0,1%) в течение 20 мин [19].

Для изучения эффекта катионных пептидов на процессы плёнокообразования готовили серию двукратных разведений пептидов в диапазоне концентраций 8–512 мкг/мл в полистироловых планшетах в среде LB с 0,5% глюкозой (объём среды в лунке 100 мкл). В качестве контроля использовали среду LB с 0,5% глюкозой без добавления пептидов. Затем в лунки добавляли по 100 мкл суспензии бактерий, содержащей 10⁷ КОЕ/мл, и культивировали аналогично указанной выше методике. Концентрацию пептидов, при которой наблюдали ингибирование биоплёнокообразования на 50% (IC₅₀) определяли по кривой, отражающей зависимость интенсивности образования биоплёнок от содержания пептидов в среде роста *P.acnes* (доза–эффект) компьютерной программы GraphPad Prism 6.0 [20].

Статистическая обработка и анализ полученных результатов осуществлялись с использованием метода ANOVA с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 6.0. Данные представляли в виде $M \pm SD$ трёх независимых экспериментов. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что бактерии обладают выраженной способностью адаптироваться к ингибирующему действию антибиотиков, что приводит к появлению новых биологических особенностей клеток, показанному нами, в частности, для *S.epidermidis* ГИСК 33 [21]. В связи с полученными данными, были проведены эксперименты по изучению возможностей формирования бактериями *P.acnes* VKM Ac-1450 резистентности к антибиотикам, широко используемым в медицинской практике, в частности, к рифампицину и тетрациклину, минимальные ингибирующие концентрации которых для бактерий *P.acnes* VKM Ac-1450 составляли 4 и 2 мкг/мл, соответственно. Путем селекции на жидкой среде с добавлением антибиотика были получены два штамма: *P.acnes* VKM Ac-1450 Rif^r, обладающие устойчивостью к рифампицину о чём свидетельствовало полное отсутствие зоны подавления роста вокруг диска с этим антибиотиком, а так же *P.acnes* VKM Ac-1450 Tet^r, устойчивые к тетрациклину. Важно отметить, что приобретение устойчивости к указанным антибиотикам сопровождалось изменением чувствительности *P.acnes* VKM Ac-1450 к гента-

мицину и оксациллину (табл. 1). Культивирование полученных резистентных бактерий на питательных средах без добавления антибиотиков, не приводило к восстановлению чувствительности резистентных штаммов *P.acnes* VKM Ac-1450 к данным антибиотическим агентам. Следует отметить, что полученные штаммы бактерий устойчивых к рифампицину и тетрациклину были адаптированы к содержанию антибиотиков в среде роста в концентрации 20 мкг/мл, что превышает содержание рифампицина в 1,5 раза, а тетрациклина почти в 3 раза по сравнению с концентрациями этих препаратов, достигаемых в сыворотке крови при терапии инфекционных заболеваний человека и животных [22, 23].

В настоящее время известно более 40 генов бактерий, ответственных за устойчивость к тетрациклину, антибактериальное действие которого основано на подавлении белкового синтеза [24]. Чаще гены устойчивости к данному антибиотику локализованы на мобильных генетических элементах. Один из механизмов устойчивости к тетрациклину связан с синтезом эффлюксных белков, которые ограничивают поступление тетрациклина в клетку. Другой вариант устойчивости подразумевает наличие защитных белков, препятствующих взаимодействию тетрациклина с 30S-субъединицей рибосом [25]. В отличие от разнообразных механизмов резистентности бактерий к тетрациклину, устойчивость бактерий, в том числе и *P.acnes*, к рифампицину, чаще всего, обусловлена возникновением точечных мутаций в гене *groV*, кодирующем β -субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы. В результате возникающих изменений в строении фермента связывание антибиотика с данной субъединицей становится невозможным и не происходит ингибирования транскрипции РНК [12]. Вместе с тем, формирование резистентности *P.acnes* VKM Ac-1450 к антибиотикам сопровождалось повышением адгезионной активности бактерий (рис. 1, а, б). Так, с помощью МАТН-теста мы установили, что клетки антибиотикорезистентных штаммов

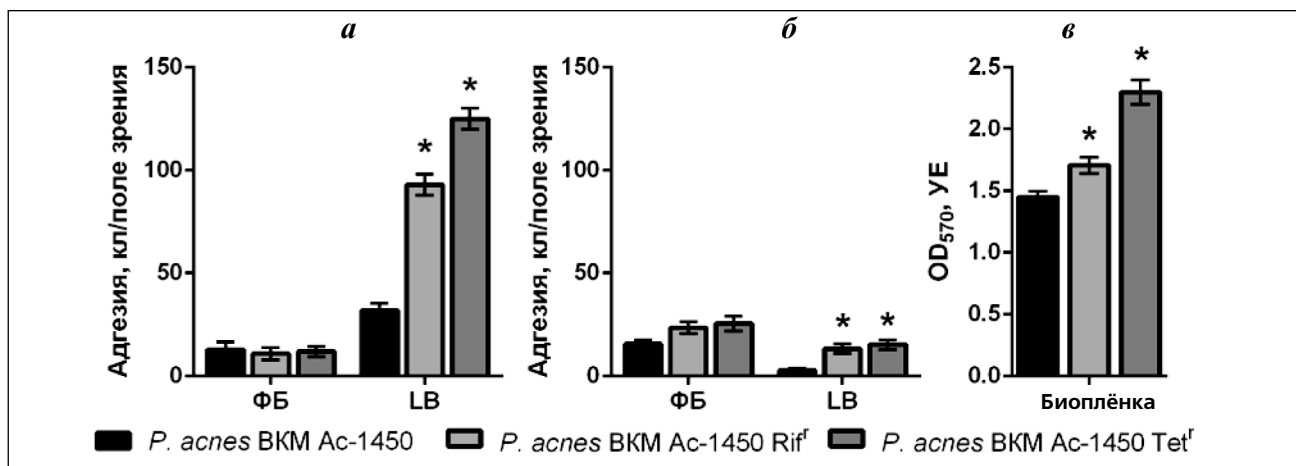


Рис. 1. Адгезия бактерий *P. acnes* VKM Ac-1450, *P. acnes* VKM Ac-1450 Rif^r и *P. acnes* VKM Ac-1450 Tet^r на поверхностях полистирола (а) и стекла (б) и биомасса плёнок *P. acnes*, сформированных за 48 ч при инкубации в среде LB с 0,5% глюкозы (в).

* — достоверное отличие от родительского штамма.

проявляли большее сродство к п-гексадекану по сравнению с клетками исходного штамма (менее 3%), что свидетельствует о возрастании общей гидрофобности поверхности клеток до 8% для штамма *P. acnes* VKM Ac-1450 Rif^r и до 10% для *P. acnes* VKM Ac-1450 Tet^r.

Однако, несмотря на выраженную гидрофильность клеточных оболочек пропионовых бактерий, их сорбция на смачиваемой поверхности, такой как стекло, оставалась незначительной (рис. 1, б). В то же время наблюдалась интенсивная адгезия исследуемых бактерий на поверхности полистирола при их инкубации в питательной среде LB. Выявленный факт можно объяснить формированием кондиционной плёнки за счёт адсорбции на полистироле молекул нуклеотидов, пептидов, аминокислот и т. п., содержащихся в питательном бульоне, что способствовало необратимой адгезии бактерий [26]. Важно отметить, что адгезия к полистиролу клеток антибиотикорезистентных штаммов *P. acnes* в среде LB в разы превышала таковую родительского штамма (рис. 1, а).

Аналогично увеличению адгезионной активности, существенно возрастала биомасса зрелых биоплёнок резистентных *P. acnes* Ac-1450 (рис. 1, в). Так, при инкубации пропионовых бактерий в планшетах в течение 48 ч в среде LB, содержащей глюкозу, наблюдалось интенсивное образование биоплёнок на поверхности полистирола. После экстракции связавшегося с плёнками красителя, наибольшая биомасса выявлена у бактерий, резистентных к тетрациклину (рис. 1, в). Эффлюксный механизм устойчивости к тетрациклину основан на работе двухкомпонентных сигнальных регуляторных систем, которые могут активировать работу нескольких генов, в том числе ответственных за синтез поверхностных белков — адгезинов [27], а также генов биосинтеза внеклеточных полисахари-

дов или аутолизина [28]. Активация аутолизина может способствовать возрастанию адгезионной активности бактериальных клеток как за счёт прямого взаимодействия с полимерной поверхностью [29], так и опосредованно вследствие высвобождения внеклеточной ДНК при лизисе части клеток, что способствует образованию биоплёнок оставшейся частью популяции [30]. Возможно, что данные эффекты имели место в активации адгезионной активности и биоплёнокообразования бактерий *P. acnes*, устойчивых к тетрациклину.

Ранее было показано, что бактерии *P. acnes* VKM Ac-1450 чувствительны к действию антибактериальных катионных пептидов, выделенных из сред роста стафилококков [31]. Антагонистические отношения между родами *Staphylococcus* и *Propionibacterium* обусловлены единством их экологических и выраженной межвидовой конкуренцией. Чаще всего подавление ближайшего конкурентного окружения происходит посредством синтеза антибактериальных катионных пептидов [32]. Динамика гибели бактерий *P. acnes* VKM Ac-1450 под действием стафилококковых бактериоцинов варнерина и хоминина была изучена в настоящей работе. Установлено, что полная гибель бактерий родительского штамма происходила уже через 3 ч действия пептидов (рис. 2).

Исследование чувствительности *P. acnes* Ac-1450 Tet^r и *P. acnes* Ac-1450 Rif^r к варнерину и хоминину показало, что с приобретением устойчивости к антибиотикам у бактерий не изменился уровень чувствительности к стафилококкцинам. Как для исходных, так и для резистентных бактерий минимальная подавляющая концентрация (МПК) обоих антибактериальных пептидов составляла 8 мкг/мл.

При изучении роста биоплёнок пропионовых бактерий в присутствии варнерина и хоминина

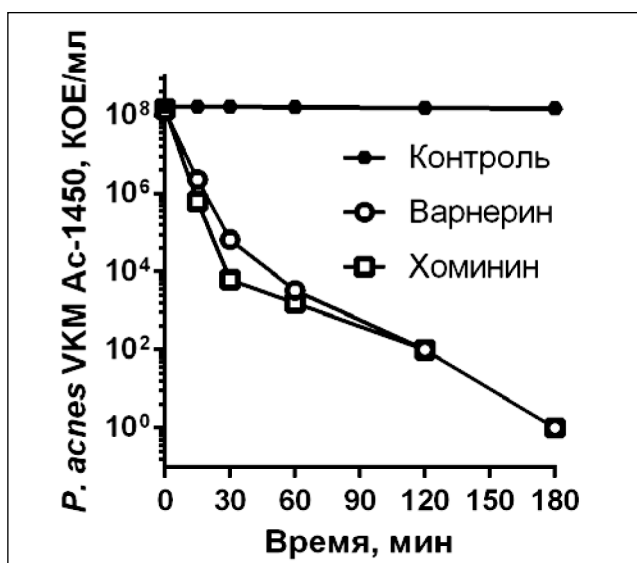


Рис. 2. Динамика гибели бактерий *P.acnes* VKM Ac-1450 под действием варнерина и хоминина.

показано, что подавление образования биоплёнок бактерий всех исследованных штаммов (minimal biofilm inhibitory concentration, MBIC) происходит при концентрациях варнерина и хоминина равных 256 мкг/мл (рис. 3). В то же время снижение биомассы плёнок происходит во всем диапазоне исследованных концентраций антибактериальных пептидов (8–512 мкг/мл). При этом концентрация варнерина и хоминина, ингибирующая формирование биоплёнок на 50% по сравнению с максимально возможным, различалась как между пептидами, так и для разных штаммов пропионо-

вых бактерий (табл. 2). Наибольший эффект выявлен в присутствии хоминина в отношении бактерий, резистентных к тетрациклину. Ингибирование формирования биоплёнок бактериями *P.acnes* Ac-1450 Tet^r наполовину происходило в присутствии 41,6 мкг/мл хоминина. Для варнерина данное значение было выше в 2,4 раза. Следует отметить, что различие значений IC₅₀ в отношении биоплёнок и соответствующей ей МПК планктонной культуры в 5–12 раз связано с большей устойчивостью бактерий в составе биоплёнки. Именно это отличие и следует учитывать при подборе лечения инфекций, связанных с образованием биоплёнок. Результаты проведенных исследований показали выраженную способность пропионовых бактерий к формированию биоплёнок, развитие которых замедляется в присутствии антибактериальных пептидов, выделенных из сред роста стафилококков.

Заключение

Таким образом, в работе показана возможность быстрой адаптации *P.acnes* к негативному действию антибиотиков рифампицина и тетрациклина, в частности. Появление резистентности приводит к увеличению способности бактерий адгезироваться на гидрофобной поверхности и формировать биоплёнки, что особенно выражено у бактерий, резистентных к тетрациклину. Полученные антибиотикорезистентные штаммы пропионовых бактерий обладают высокой чувствительностью к бактериоцинам стафилококков, представляющих собой низкомолекулярные катионные пептиды семейства лантиби-

Таблица 2. Концентрация пептидов (мкг/мл), ингибирующая развитие биоплёнок *P.acnes* на 50%

Пептид	Концентрация пептида, вызывающая торможение роста биоплёнок <i>P.acnes</i> на 50%, мкг/мл		
	<i>P.acnes</i> VKM Ac-1450	<i>P.acnes</i> VKM Ac-1450 Tet ^r	<i>P.acnes</i> VKM Ac-1450 Rif ^r
Варнерин	82,8±2,5	70,6±1,1	98,6±2,4
Хоминин	79,6±1,9	83,4±1,0	41,6±1,3

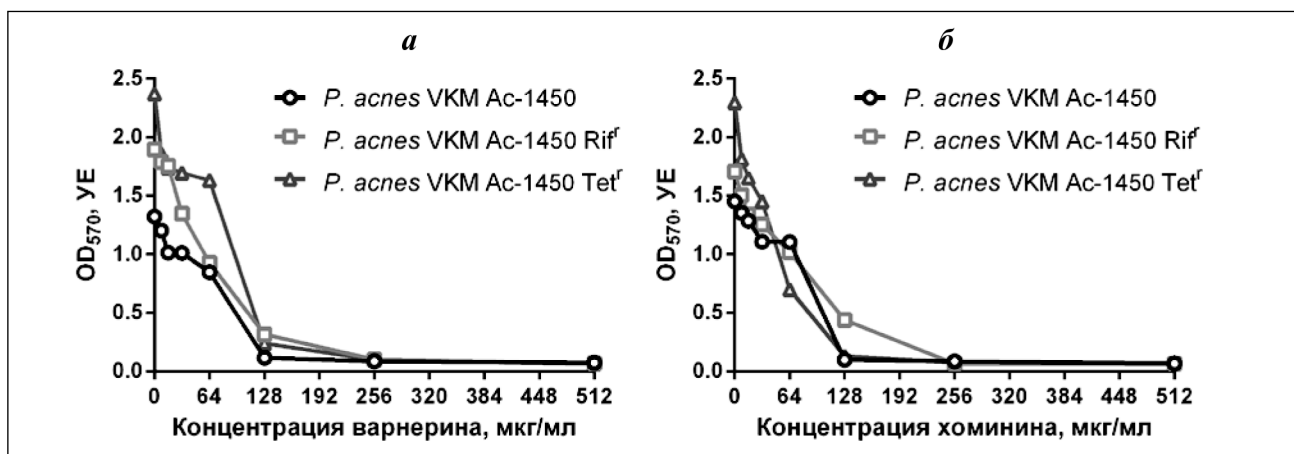


Рис. 3. Формирование биоплёнок *P.acnes* VKM Ac-1450, *P.acnes* VKM Ac-1450 Rif^r и *P.acnes* VKM Ac-1450 Tet^r на поверхностях полистирола в присутствии варнерина (а) и хоминина (б).

отиков [33]. Для всех изученных штаммов *P.acnes* МПК составляла 8 мкг/мл, однако МВІС была существенно выше — 256 мкг/мл. Выявленная в работе чувствительность *P.acnes* VKM Ас-1450 и его резистентных вариантов, а также процессов плёнообразования к катионным пептидам стафилококков, основанная на явле-

ЛИТЕРАТУРА

1. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C. et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 1057–1098.
2. Walsh T.R., Efthimiou J., Dréno B. Systematic review of antibiotic resistance in acne: An increasing topical and oral threat. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: e23–33.
3. Sousa D., Justo I., Domínguez A. et al. Community-acquired pneumonia in immunocompromised older patients: incidence, causative organisms and outcome. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 187–192.
4. Harder J., Tsuruta D., Murakami M., Kurokawa I. What is the role of antimicrobial peptides (AMP) in acne vulgaris? *Exp Dermatol* 2013; 22: 386–391.
5. Furustrand T. U., Corvec S., Betrisey B., Zimmerli W., Trampuz A. Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm *in vitro* and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1885–1891.
6. Oprica C., Nord C.E., Kalenic S. et al. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 204–213.
7. Vergidis P., Rouse M.S., Euba G. et al. Treatment with linezolid or vancomycin in combination with rifampin is effective in an animal model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* foreign body osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (3): 1182–1186.
8. Soderquist B., Holmberg A., Unemo M. *Propionibacterium acnes* as an etiological agent of arthroplastic and osteosynthetic infections—two cases with specific clinical presentation including formation of draining fistulae. *Anaerobe* 2010; 16: 304–306.
9. Guarna M., Coulson R., Rubinchik E. Anti-inflammatory activity of cationic peptides: application to the treatment of acne vulgaris. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 257: 1–6.
10. Popovic S., Urbán E., Lukic M., Conlon J.M. Peptides with antimicrobial and anti-inflammatory activities that have therapeutic potential for treatment of acne vulgaris. *Peptides* 2012; 34 (2): 275–282.
11. Kang B.S., Seo J.-G., Lee G.-S. et al. Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *J Microbiol* 2009; 47 (1): 101–109.
12. Furustrand T. U., Trampuz A., Corvec S. *In vitro* emergence of rifampicin resistance in *Propionibacterium acnes* and molecular characterization of mutations in the *rpoB* gene. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 523–528.
13. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». 2004. / *Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04 «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam»*. 2004. [in Russian]
14. Ерошенко Д.В., Коробов В.П. Сравнительный анализ формирования и разрушения биоплёнок PIA-отрицательных бактерий *Staphylococcus epidermidis* под действием гидролитических факторов. *Вестник ТГУ Биология*. — 2015. — № 1. — С. 28–36. / *Eroshenko D.V., Korobov V.P. Sravnitel'nyy analiz formirovaniya i razrusheniya bioplyonok PIA-otritsatel'nykh bakterij Staphylococcus epidermidis pod deystviem gidroliticheskikh faktorov*. *Vestnik TGU Biologiya* 2015; 1: 28–36. [in Russian]
15. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 1980; 9: 29–33.
16. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полодова Т.В. Антибактериальный пептид хоминин klp-1 широкого спектра действия. Патент РФ № 2528055. — 2014. / *Korobov V.P., Lemkina L.M., Polyudova T.V. Antibakterial'nyy peptid khominin klp-1 shirokogo spektra deystviya*. Patent RF № 2528055. 2014. [in Russian]
17. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полодова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков. *Микробиология*. — 2010. — Т. 79. — № 2. — С. 228–238. / *Korobov V.P., Lemkina L.M., Polyudova T.V., Akimenko V.K. Vydelenie i kharakteristika novogo nizkomolekulyarnogo antibakterial'nogo peptida semejstva lantibiotikov*. *Mikrobiologiya* 2010; 79 (2): 228–238. [in Russian]
18. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
19. Stepanović S., Vuković D., Hola V. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115: 891–899.
20. Rautenbach M., Gerstner G.D., Vlok N.M., Kulenkampff J., Westerhoff H.V. Analyses of dose-response curves to compare the antimicrobial activity of model cationic α -helical peptides highlights the necessity for a minimum of two activity parameters. *Anal Biochem* 2006; 350: 81–90.
21. Коробов В.П., Полодова Т.В., Лемкина Л.М. Изучение биологических свойств антибиотикорезистентных бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 и их чувствительности к варнерину. *Вестник ПГУ Биология*. — 2015. — № 1. — С. 5–14. / *Korobov V.P., Polyudova T.V., Lemkina L.M. Izuchenie biologicheskikh svoystv antibiotikorezistentnykh bakterij Staphylococcus epidermidis 33 i ikh chuvstvitel'nosti k varnerinu*. *Vestnik PGU Biologiya* 2015; 1: 5–14. [in Russian]
22. Kumar R., Malik J.K. Some pharmacokinetic parameters and dosage regimens for a long-acting formulation of oxytetracycline in 6- to 8-month-old male calves. *Vet Res Commun* 1998; 22 (8): 533–544.
23. Shimomura H., Andachi S., Aono T. et al. Serum concentrations of clarithromycin and rifampicin in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease: long-term changes due to drug interactions and their association with clinical outcomes. *J Pharm Health Care Sci* 2015; 1: 32.
24. Селизарова Н.О. Антибиотики, нарушающие синтез макромолекул. *Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии*. — 2003. — Т. 2. — № 1. — С. 70–78. / *Selizarova N.O. Antibiotiki, narushayushchie sintez makromolekul*. *Obzory po klinich. farmakol. i lek. terapii* 2003; 2 (1): 70–78. [in Russian]
25. Ковалевская Н.П. Интегративные конъюгативные элементы: эволюция микробной резистентности к антибиотикам. *Фундаментальные исследования*. — 2015. — № 1. — С. 284–289. / *Kovalevskaya N.P. Integrativnye kon'yugativnye elementy: evolyutsiya mikrobnoy rezistentnosti k antibiotikam*. *Fundamental'nye issledovaniya* 2015; 1: 284–289. [in Russian]
26. Ishiguro R., Yokoyama Y., Maeda H., Shimamura A., Kameyama K., Hiramatsu K. Modes of conformational changes of proteins adsorbed on a planar hydrophobic polymer surface reflecting their adsorption behaviors. *J Colloid Interface Sci* 2005; 290: 91–101.
27. Crosby A.H., Schlievert M.P., Merriman J.A., King J.M., Salgado-Pabón W., Horswill A.R. The *Staphylococcus aureus* global regulator MgrA modulates clumping and virulence by controlling surface protein expression. *PLoS Pathog* 2016; 12 (5): e1005604.
28. Ding Y., Onodera Y., Lee J.C., Hooper D.C. NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *J Bacteriol* 2008; 190 (21): 7123–9.
29. Heilmann C., Hussain M., Peters G. et al. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 1997; 24: 1013–1024.
30. Qin Z., Ou Y., Yang L. et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol* 2007; 153: 2083–2092.
31. Полодова Т.В., Коробов В.П., Зидина Н.М. Сравнительный анализ формирования биоплёнок бактериями *Propionibacterium acnes* Ас-1450 на нативных и обработанных катионными пептидами поверхностях полистирола. *Российский иммунологический журнал. Тематический выпуск, приуроченный к Пермскому научному форуму*. — 2015. — Т. 9. — № 2. — С. 661–663. / *Polyudova T.V., Korobov V.P., Zidina N.M. Sravnitel'nyy analiz formirovaniya bioplenok bakteriyami Propionibacterium acnes Ac-1450 na nativnykh i obrabotannykh kationnymi peptidami poverkhnostyakh polistirola*. *Rossiyskij immunologicheskij zhurnal. Tematicheskij vypusk, priurochennyj k Permskomu nauchnomu forumu* 2015; 9 (2): 661–663. [in Russian]
32. Christensen G.J.M., Scholz C.F.P., Enghild J. et al. Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis. *BMC Genomics* 2016; 17:152.

33. Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков. Приклад биохим и микробиол. — 2017. — Т. 53. — № 1. — С. 47—54. /

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Полюдова Татьяна Вячеславовна — к. б. н., научный сотрудник Лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (<http://www.iegim.ru/>); доцент кафедры экологии Пермского государственного аграрно-технологического университета им. акад. Д. Н. Прянишникова, член Межрегиональной общественной организации «Микробиологическое общество», Пермь

Ерошенко Дарья Владимировна — к. б. н., младший научный сотрудник Лаборатории биохимии развития микроорга-

Polyudova T.V., Lemkina L.M., Likhatskaya G.N., Korobov V.P. Optimizatsiya usloviy polucheniya i modelirovanie 3D-ctrukтуры novogo antibakterial'nogo peptida semejstva lantibiotikov. Priklad biokhim i mikrobiol 2017; 53 (1): 47—54. [in Russian]

низмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, член Межрегиональной общественной организации «Микробиологическое общество», Пермь

Коробов Владимир Павлович — к. м. н., заведующий Лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; доцент кафедры биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета, Пермь

Диабетическая стопа: возможности антибактериальной и антиоксидантной терапии

В. И. СОКОЛОВА¹, Д. А. СЫЧЕВ¹, М. Б. БАБАРИНА², Е. И. ВАСИЛЬЕВА³

¹ Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования Минздрава России

² Национальный медицинский центр эндокринологии Минздрава России, Москва

³ Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва

Diabetic Foot: The Possibilities of Antibacterial and Antioxidant Therapy

V. I. SOKOLOVA¹, D. A. SYCHEV¹, M. B. BABARINA², E. I. VASILYEVA³

¹ Russian Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² National Medical Center of Endocrinology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

³ Scientific Clinical Center of JSC Russian Railways, Moscow

Представлены результаты микробиологического исследования раневого отделяемого от 97 больных сахарным диабетом. Из 126 выделенных штаммов, лидирующими патогенами были бактерии рода *Staphylococcus* (54%), *Enterococcus* (14%) и *Streptococcus* (13%). Из грамотрицательных — *Escherichia coli* (5%). Неферментирующие грамотрицательные бактерии составили 3% и были представлены бактериями *Pseudomonas aeruginosa* (2%) и *Acinetobacter* (1%). Отмечена высокая активность амоксицикла, имипенема и цефоперазона/сульбактама в отношении большинства как грамположительных, так и грамотрицательных культур. Чувствительность к фторхинолонам варьировала от 75 до 100%. Наибольшей активностью обладали левофлоксацин и моксифлоксацин. Для лечения 14 больных был применён внутриартериальный способ длительной, непрерывной инфузии левофлоксацина (500 мг/сут.) и последовательного введения изоксимебрамида (полиоксидоний — ПО, 12 мг/сут.) через постоянное имплантированное устройство порт-катетер. Комплексная терапия привела к быстрому регрессу клинических проявлений инфекционно-болевого синдрома с последующей грануляцией и эпителизацией раневого дефекта. Нежелательные эффекты не зарегистрированы ни у одного пациента на протяжении всего курса терапии (10—12 дней).

Ключевые слова: сахарный диабет, синдром диабетической стопы, возбудители, комплексная терапия, левофлоксацин, полиоксидоний, внутриартериальный способ введения, порт-катетер.

The article presents the results of a microbiological study of wound fluid from 97 patients with diabetes mellitus. Of 126 isolated strains, the leading pathogens were bacteria of the genus *Staphylococcus* (54%), *Enterococcus* (14%), and *Streptococcus* (13%). The leading pathogen among gram-negative bacteria was *Escherichia coli* (5%). Nonfermentative gram-negative bacteria amounted for 3% and were represented by *Pseudomonas aeruginosa* (2%) and *Acinetobacter* (1%) bacteria. High activity of amoxiclav, imipenem and cefoperazone/sulbactam in the majority of both gram-positive and gram-negative cultures was noted. Sensitivity to fluoroquinolones ranged from 75% to 100%. Levofloxacin and moxifloxacin were the most active. To treat 14 patients, we used an intraarterial method of continuous infusion of levofloxacin (500 mg/day) and sequential administration of isoximere bromide (polyoxidonium — PO, 12 mg/day) through a permanent implanted catheter device. Complex therapy led to a rapid regression of clinical manifestations of the infectious and pain syndromes followed by granulation and epithelization of the wound. Undesirable effects are not recorded in any patient throughout the course of therapy (10—12 days).

Keywords: diabetes mellitus, diabetic foot syndrome, pathogens, complex therapy, levofloxacin, polyoxidonium, intraarterial administration, port catheter.

Введение

Сахарный диабет остаётся острой проблемой, что связано с его растущей распространённостью и высоким риском невропатий и микро-макро-сосудистых осложнений, в частности синдрома диабетической стопы (СДС). Микроангиопатия наблюдается у 100% больных сахарным диабетом (СД), при этом у 30% пациентов имеются гнойно-некротических осложнения [1—5]. Стресс, высокое артериальное давление также являются провоцирующими факторами для язвообразования, что в 35% случаев приводит к ампутации. Перифери-

ческая ангиопатия приводит к изъязвлению конечностей и снижает способность противостоять инфекции, снижая доставку кислорода, питательных веществ и антибиотиков в инфицированную зону. Атеросклеротические бляшки инициируют тромбозы и окклюзию сосудов, вызывая периферическую ишемию. Больные с сахарным диабетом имеют плохое коллатеральное кровоснабжение, что приводит к трофическим нарушениям кожи. Снижение кожной защиты на стопе, пальцах, голенях способствует проникновению патогенов и образованию микротромбов, что усиливает ишемию и инфекцию [6, 7].

Цель работы — обратить внимание на основные клинические признаки раневой инфекции у больных СД, изучить этиологическую структуру возбудителей и их чувствительность к антианти-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 125993, город Москва, Баррикадная улица, дом 2/1 строение 1. РМАНПО

кам, применить для лечения СДС комплексную антибактериальную терапию (левофлоксацином) в сочетании с иммуномодулятором полиоксидонием (ПО), оценить её эффективность.

Материал и методы

Одним из этапов лечения инфекционного процесса является микробиологическое изучение гнойного отделяемого. Проведено исследование гнойно-некротического субстрата, полученного из ран от 97 больных СД. Выделено 126 штаммов патогенов, подтверждена инфекционная природа воспаления в 91% случаев. Первичный посев клинического материала выполняли по Вуду, петлёй диаметром 2 мм, на поверхность 5% кровяного агар и ряд селективных сред (агар Эндо, маннит-солевой, Сабуро и др.). Степень обсеменённости раневого отделяемого определяли по таблице Рябинского-Родмана по аналогии с определением бактериурии при посевах мочи. Идентификацию изолятов проводили с помощью коммерческих тест систем ErbaLachema (Чехия), bioMerieux (Франция). Оценку чувствительности выделенных штаммов к антибактериальным препаратам проводили дискодиффузионным методом на агаре Mueller-Hinton.

Результаты исследования

Изучена микрофлора, выделенная из ран больных диабетом. Всего было получено 126 штаммов микроорганизмов (рис. 1, 2).

Основными возбудителями инфекции были грамположительные бактерии (Гр+), их выделено 103 штамма (82%). Среди них преобладали (рис. 1) культуры рода *Staphylococcus* ($n=68$, 65%), в частности *S. aureus* (41%, $n=42$). Культуры рода *Enterococcus* и *Streptococcus* выделялись в 17 и 16% случаев ($n=17$ и $n=16$), *Streptococcus pyogenes* составил 3% ($n=3$), *Corynebacterium* обнаружены в 2% ($n=2$).

Грамотрицательные (Гр-) бактерии (рис. 2) составили 17% ($n=21$), среди них доминировали представители семейства Enterobacteriaceae: 29% — *E. coli* ($n=6$), 19% — *Klebsiella* ($n=4$), 14% — *Proteus* ($n=3$), по 10% *Citrobacter* и *Enterobacter* ($n=2$ и 2). Неферментирующие Гр- бактерии (НГОБ) были представлены: 14% — *Pseudomonas aeruginosa* ($n=3$) и 4% — *Acinetobacter* ($n=1$). В 1,5% посевов раневого отделяемого обнаружен рост грибов рода *Candida* ($n=2$). Из 97 исследований биоматериала в 36 случаях выявлялись ассоциации возбудителей в количестве: двух ($n=31$), трёх ($n=2$) и четырёх ($n=3$).

Результаты определения чувствительности выделенных из ран патогенов представлены в табл. 1—7.

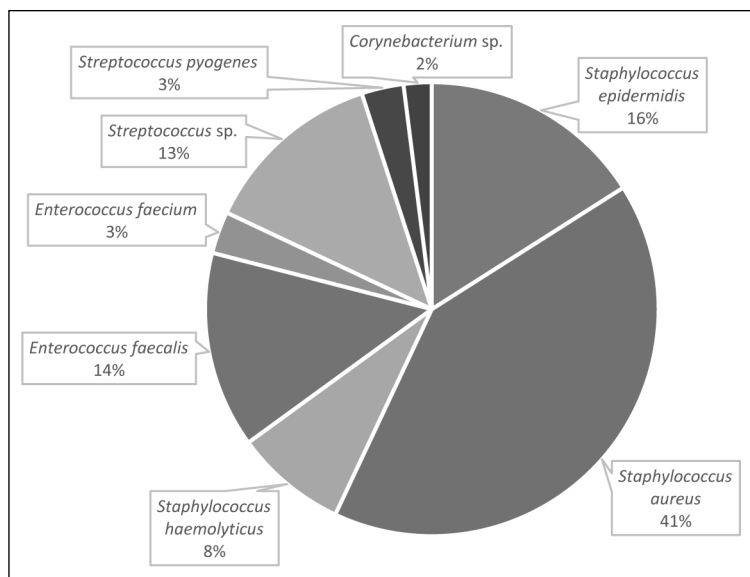


Рис. 1. Доля различных видов грамположительных культур ($n=82$), выделенных из раневого отделяемого больных отделения эндокринологии (2015–2017 гг.)

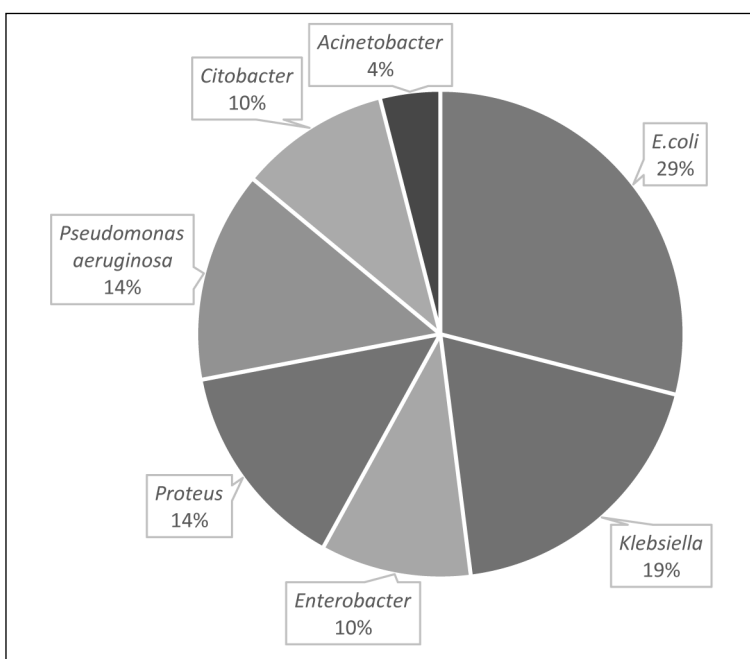


Рис. 2. Доля различных видов грамотрицательных культур ($n=21$), выделенных из раневого отделяемого больных отделения эндокринологии (2015–2017 гг.)

Анализ 126 штаммов, выделенных из раневого отделяемого больных эндокринологического отделения показал, что лидирующими патогенами были бактерии рода *Staphylococcus* (54%), *Enterococcus* (14%) и *Streptococcus* (13%). Из грамотрицательных — *E. coli* (5%). Отмечена высокая активность амоксиклава, имипенема и цефоперазон/сульбактама в отношении большинства как Гр+, так и Гр- культур. Чувствительность к фтор-

Таблица 1. Чувствительность раневых патогенов к левофлоксацину

Культура	Всего исследований	S (в %)	I (в %)	R (в %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	34	88,2	5,9	5,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	33,3	25	41,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	81,8	0	18,2
<i>Enterococcus faecium</i>	3	0	33,3	66,7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	37,5	37,5	25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	100	0	0
<i>Escherichia coli</i>	4	75	25	0
<i>Proteus mirabilis</i>	3	100	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	50	0	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	100	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	0	100

Примечание. Здесь и в табл.: 2–7: S – чувствительные микроорганизмы; I – умеренно устойчивые; R – устойчивые.

Таблица 2. Чувствительность раневых патогенов к моксифлоксацину

Культура	Всего исследований	S (в %)	I (в %)	R (в %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	92	8	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	83,3	16,7	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	66,7	0	33,3
<i>Enterococcus faecium</i>	2	0	0	100
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	75	25	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	100	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	100	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	100	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	100	0	0

Таблица 3. Чувствительность раневых патогенов к офлоксацину

Культура	Всего исследований	S (в %)	I (в %)	R (в %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	73	16,2	10,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	40	6,7	53,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	22,2	55,6	22,2
<i>Enterococcus faecium</i>	3	0	0	100
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9	44,4	0	55,6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	0	100	0
<i>Escherichia coli</i>	3	66,7	0	33,3
<i>Proteus mirabilis</i>	1	100	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	100	0	0

Таблица 4. Чувствительность раневых патогенов к амоксициллину

Культура	Всего исследований	S (в %)	I (в %)	R (в %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	39	84,6	2,6	12,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17	64,7	0	35,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	100	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	3	100	0	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	87,5	0	12,5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	100	0	0
<i>Escherichia coli</i>	5	100	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	100	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0	100

хинолонам варьировала от 75 до 100%. Наибольшей активностью обладали левофлоксацин и моксифлоксацин. Эти антибиотики широко используются для лечения тяжёлых инфекций, благодаря их хорошему фармакокинетическим характеристикам [8–10].

Результаты комплексной терапии. В хирургическом отделении находились на лечении 14 пациентов с диагнозом диабетическая стопа. Это были тяжёлые больные с гнойно-некротическими язвами и выраженным интоксикационным синдромом. У этих больных основные симптомы, характеризующие ангиопатию и невропатию включали: мышечную слабость, гипертензию,

жжение стоп, боль, снижение тактильной чувствительности, ослабление или отсутствие периферической пульсации, отёки нижних конечностей и др. У всех ($n=14$) больных также проводилось бактериологическое исследование гнойно-некротического биоматериала. Микробиологический пейзаж был представлен: *S.aureus* ($n=4$), *S.epidermidis* ($n=2$), *S.pyogenes* ($n=3$), *P.aeruginosa* ($n=2$), *Acinetobacter* ($n=2$), *Klebsiella pneumoniae* ($n=1$). Все культуры были чувствительны к левофлоксацину, кроме *Acinetobacter*. Известно, что большинство микроорганизмов существуют в виде структурированных биоплёнок, прикреплённых к раневой поверхности или друг к другу сооб-

Таблица 5. Чувствительность раневых патогенов к цефепиму

Культура	Всего исследований	S (в %)	I (в %)	R (в %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	80	20	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	0	33,3	66,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	0	0	100
<i>Escherichia coli</i>	3	100	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	100	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	50	0	50
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	1	0	0	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	100	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	33,3	0	66,7
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	0	100

Таблица 6. Чувствительность раневых патогенов к цефоперазону/сульбактаму

Культура	Всего исследований	S (в %)	I (в %)	R (в %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	93,3	6,7	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	66,7	22,2	11,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	0	25	75
<i>Escherichia coli</i>	6	100	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	100	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	100	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	1	0	0	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	33,3	0	66,7
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	100	0	0

Таблица 7. Чувствительность раневых патогенов к имипенему

Культура	Всего исследований	S (в %)	I (в %)	R (в %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	100	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	85,7	0	14,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	87,5	12,5	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	100	0	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	100	0	0
<i>Escherichia coli</i>	4	100	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	100	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	50	0	50
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	2	50	50	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	100	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	66,7	0	33,3
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	0	100

ществ — биоплёнок. Биоплёнки заключены в матрикс и они определяют этиологию и патогенез острых и особенно хронических инфекций у человека [11–13]. Биоплёнки препятствуют проникновению антибиотика в клетку, следовательно, не создаются действующие концентрации препарата в очаге инфекции. Кроме того, многие возбудители обладают адгезивными свойствами, что способствует их развитию и размножению в раневой поверхности.

Нами был применён внутриартериальный способ длительной, непрерывной инфузии левофлоксацина (500 мг/сут) и последовательного введения изоксимерабромида — полиоксидоний (ПО), 12 мг/сут через постоянное имплантированное устройство порт-катетер. Антибиотик при таком способе введения тут же поступает в системный кровоток и быстро создаются максимальные концентрации левофлоксацина ($C_{\max}$ 5,2–6,2 мг/л) в очаге инфекции. Длительный период полувыведения ($T_{1/2}$) — 7–7,5 ч позволяет использовать антибиотик один раз в сутки. Кроме того,

антибиотик способствует угнетению адгезивных свойств возбудителей в ране. К концу вторых суток комплексной терапии наблюдалась тенденция к улучшению общего самочувствия: нормализация температуры, исчезновение ночных болей, отёков нижних конечностей, и др. Известно, что инфекция у больных СД протекает на фоне иммунной недостаточности, это влияет на динамику течения инфекционного процесса и скорость закрытия раневого дефекта [14–16]. При использованной нами комплексной терапии первые очаги грануляции появились к концу 5–7 сут лечения. На 8–10-е сут рана очищалась от гнойного содержимого, наблюдалась грануляция и эпителизация раневого дефекта, нормализовались клиничко-лабораторные показатели. Курс терапии составил 10–12 дней. Отмечено, что под влиянием полиоксидоний (ПО) происходило не только восстановление пониженных у больных ($n=14$) уровней лимфоцитов в периферической крови, но и подрастание их до нормальных показателей (37–40%). Наблюдалась положительная

динамика биомаркёров (СРБ, прокальцитонин и др.). Нежелательные эффекты не зарегистрированы ни у одного пациента на протяжении всего курса терапии.

Обсуждение результатов

В ряде работ [17–22] показано, что полиоксидоний активирует все звенья фагоцитоза, способствует увеличению уровней IgA и IgG, оказывает иммуномодулирующее влияние на цитокиновую систему, корригирует дисбаланс цитокинов, стимулирует как про-, так и противовоспалительные цитокины, интерфероны. Нами был применен антиоксидант — полиоксидоний в суммарной дозе 96–120 мг/сут в сочетании с левофлоксацином (500 мг/сут). Показано, что выбранная схема комплексного лечения через порт-катетер способствовала купированию интоксикационных проявлений и разрешению инфекционно-воспалительного процесса на 8–10-е сут.

При выборе этиотропной терапии необходимо также учитывать тот факт, что язвенный дефект может быть инфицирован как аэробами и факультативными анаэробами, так и анаэробами. Многие патогены продуцируют гиалуронидазу, что усиливает некроз тканей и способствует распространению некротического процесса с вовлечением подкожно-жировой клетчатки, кожно-связочного аппарата, мышечной ткани. Происходит тромбоз сосудов и, как следствие, поврежда-

ются новые участки мягких тканей. Обильное газообразование в инфицированных тканях при анаэробной инфекции обнаруживается как пальпаторно, так и рентгенологически. Это состояние сопровождается гипертермией, лейкоцитозом и требует хирургического вмешательства с проведением некроэктомии и назначения противоанаэробных препаратов.

Заключение

Анализ 126 штаммов, выделенных из раневого отделяемого больных СД показал, что лидирующими патогенами были бактерии рода *Staphylococcus* (54%), *Enterococcus* (14%) и *Streptococcus* (13%). Из грамотрицательных — *E.coli* (5%). Чувствительность к фторхинолонам варьировала от 75 до 100%. Наибольшей активностью обладали левофлоксацин и моксифлоксацин. Этиотропная антимикробная терапия в комплексе с полиоксидонием, улучшающим микроциркуляцию и иммунный статус, способствовала раннему регрессу инфекционно-воспалительного процесса.

Важнейшей стратегией в борьбе с ангиопатией и невропатией является профилактика. Необходимо исключить факторы риска: курение, проводить коррекцию гипертензии, гиперлипидемии и гипергликемии. Главное условие предотвращения поражения нижних конечностей — компенсация сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

- Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство». 2011. — 808 с. / *Sakharnyj diabet: diagnostika, lechenie, profilaktika*. Pod red. I.I. Dedova, M.V. SHestakovoj. M.: ООО «Izdatel'stvo «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo». 2011; 808 s. [in Russian]
- Клинические рекомендации «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» / Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, 7-й выпуск. М.: 2015. — 112 с. / *Klinicheskie rekomendatsii «Algoritmy spetsializirovannoj meditsinskoj pomoshchi bol'nym sakharnym diabetom»* / Pod red. I.I. Dedova, M.V. SHestakovoj, 7-j vypusk. M.: 2015; 112 s. [in Russian]
- Дедов И.И., Шестакова М.В., Вискулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета. Сахарный диабет. — 2017. — Т. 20. — № 1. — С. 13–41. / *Dedov I.I., SHestakova M.V., Viskulova O.K. Epidemiologiya sakharnogo diabeta v Rossijskoj Federatsii: kliniko-statisticheskij analiz po dannym Federal'nogo registra sakharnogo diabeta. Sakharnyj diabet* 2017; 20: 1: 13–41. [in Russian]
- Анциферов М.Б., Галстян Г.Р., Миленская Т.М. Методические рекомендации. Эндокринология. Осложнения сахарного диабета (Клиника, диагностика, лечение, профилактика). М.: 1995. — 21 с. / *Antsiferov M.B., Galstyan G.R., Milen'skaya T.M. Metodicheskie rekomendatsii. Endokrinologiya. Oslozhneniya sakharnogo diabeta (Klinika, diagnostika, lechenie, profilaktika)*. M.: 1995; 21. [in Russian]
- Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030, PLoS Med 2006, 3 (11): e442.
- Ressenblum B.J., Pomposelli F.B., Freeman D.V. Maximizing foot ischemia and neuropathic ulceration in patients with diabetes. Diabetes Care 1994; 17 (9): 987.
- Дибиров М.Д., Брискин Б.С., Хамитов Ф.Ф. и соавт. Роль реконструктивных сосудистых операций у больных диабетической ангиопатией. Хирургия. — 2009. — №2. — С. 59–63. / *Dibirov M.D., Briskin B.S., Khamitov F.F. i soavt. Rol' rekonstruktivnykh sosudistykh operatsij u bol'nykh diabeticeskoi angiopatii*. Khirurgiya 2009; 2: 59–63. [in Russian]
- Зайцев А.А. Левофлоксацин в лечении хирургических и генерализованных инфекций. Инфекции в хирургии. — 2004. — Т. 2. — № 1. — С. 23–26. / *Zajtsev A.A. Levofloksatsin v lechenii khirurgicheskikh i generalizovannykh infektsij. Infektsii v khirurgii* 2004; 2: 1: 23–26. [in Russian]
- Богомолова Н.С. Химиотерапевтическая служба: задачи по профилактике и борьбе с хирургическими инфекциями в ОРИТ. Анестезиология и реанимация. — 2013. — № 2. — С. 66–72. / *Bogomolova N.S. Khimioterapevticheskaya sluzhba: zadachi po profilaktike i borbe s khirurgicheskimi infektsiyami v ORIT. Anesteziologiya i reanimatsiya* 2013; 2: 66–72. [in Russian]
- Ефименко Н.А., Гучев И.А., Сидоренко С.И. Инфекции в хирургии. Фармакотерапия и профилактика. Смоленск; 2004. — 296 с. / *Efimenco N.A., Guchev I.A., Sidorenko S.I. Infektsii v khirurgii. Farmakoterapiya i profilaktika*. Smolensk; 2004; 296. [in Russian]
- Сидоренко С.В. Роль биоплёнок в патологии человека. Инфекции в хирургии. — 2004. — Т. 2. — № 3. — С. 296. / *Sidorenko S.V. Rol' bioplyonok v patologii cheloveka. Infektsii v khirurgii*. 2004; 2: 3: 296. [in Russian]
- Соколова В.И., Шендерович В.А., Орлов В.А. Клиническое применение карбапенемов в лечении бактериальных инфекций. Учебное пособие. М.: 2007. — 19 с. / *Sokolova V.I., Shenderovich V.A., Orlov V.A. Klinicheskoe primeneniye karbapenemov v lechenii bakterial'nykh infektsij. Uchebnoe posobie*. M.: 2007; 19. [in Russian]
- Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными плёнками. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2012. — Т. 4. — № 2. — С. 68–75. / *Lyamin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V. Problemy v meditsine, svyazannye s bakterial'nymi plenkami. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2012; 4: 2: 68–75. [in Russian]
- Geerlings S.E., Hoepelman A.I. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus [DM]. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 26: 259–265.
- Larsson J., Apelqvist J., Agardh C.D., Stenstrom A. Decreasing incidence of major amputation in diabetic patients: a consequence of a multidisciplinary foot care team approach? Diabetic Med 1995; 12: 770–776.
- Лянуц М.А., Герасимчук П.А. Обоснование стандартов комплексного лечения синдрома стопы диабетика. Стандарты диагностики и лечения в гнойной хирургии. — 2001. — С. 140–147. / *Lyapits M.A., Gerasimchuk P.A. Obosnovanie standartov kompleksnogo lecheniya sindroma stopy diabeticika. Standartny diagnostiki i lecheniya v gnojnoj khirurgii* 2001; 140–147. [in Russian]

17. Елесевиц Р.В., Липин А.Н., Рухляда Н.В., Соловьев И.А. Иммунотропная терапия в составе комплексного лечения больных с синдромом диабетической стопы. Кубанский научный медицинский вестник. — 2015. — Т. 3. — № 152. — С. 49—54. / *Eleseovich R.V., Lipin A.N., Rukhlyada N.V., Solov'ev I.A.* Immunotropnaya terapiya v sostave kompleksnogo lecheniya bol'nykh s sindromom diabeticheskoy stopy. Kubanskij nauchnyj meditsinskij vestnik 2015; 3: 152: 49—54. [in Russian]
18. Латышева Т.В. Целесообразно ли использование иммуномодулятора. Полиоксидоний в комплексном лечении больных хирургического профиля? Хирургия. — 2014. — № 2. — С. 59—63. / *Latysheva T.V.* Tselesoobrazno li ispol'zovanie immunomodulyatora Polioksidoniya v kompleksnom lechenii bol'nykh khirurgicheskogo profilya? Khirurgiya 2014; 2: 59—63. [in Russian]
19. Земляной А.Б., Юсупов И.А., Кисляков В.А. Состояние цитокиновой системы при гнойно-некротических и рецидивирующих гнойно-некротических осложнениях синдрома диабетической стопы и возможности иммуномодуляции. Трудный пациент. — 2011. — № 10. — С. 1—8. / *Zemlyanoy A.B., Yusupov I.A., Kislyakov V.A.* Sostoyanie tsitokinovoy sistemy pri gnojno-nekroticheskikh i retsdiviruyushchikh gnojno-nekroticheskikh oslozhneniyakh sindroma diabeticheskoy stopy i vozmozhnosti immunomodulyatsii. Trudnyy patsient 2011; 10: 1—8. [in Russian]
20. Зеленая Т.А., Земляной А.Б., Глазанова Т.В. Применение препарата полиоксидоний в комплексном лечении синдрома диабетической стопы. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. — 2014. — № 10. — С. 113—117. / *Zelenina T.A., Zemlyanoy A.B., Glazanova T.V.* Primenenie preparata polioksidoniya v kompleksnom lechenii sindroma diabeticheskoy stopy. Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova 2014; 10: 113—117. [in Russian]
21. Удовиченко О.В., Токмакова А.Ю., Анциферов М.Б. и соавт. Клинико-морфологические характеристики репарации тканей у больных с синдромом диабетической стопы. Сахарный диабет. — 2001. — № 2. — С. 20—23. / *Udovichenko O.V., Tokmakova A.YU., Antsiferov M.B. i soavt.* Kliniko-morfologicheskie kharakteristiki reparatsii tkanej u bol'nykh s sindromom diabeticheskoy stopy. Sakharный diabet 2001; 2: 20—23. [in Russian]
22. Эргашев О.Н., Лагвилава Т.О., Виноградов Ю.М., Зиновьев Е.В. Оценка специфического фармакологического действия иммуномодуляторов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток при развитии гнойно-некротического поражения кожи на фоне диабета. Фундаментальные исследования. — 2012. — № 10. — С. 371—375. / *Ergashev O.N., Lagvilava T.O., Vinogradov YU.M., Zinov'ev E.V.* Otsenka spetsificheskogo farmakologicheskogo dejstviya immunomodulyatorov na funktsional'nuyu aktivnost' immunokompetentnykh kletok pri razvitiignojno-nekroticheskogo porazheniya kozhi na fone diabeta. Fundamental'nye issledovaniya 2012; 10: 371—375. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Соколова Валентина Ивановна — к. м. н., доцент кафедры клинической фармакологии и терапии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва

Сычев Дмитрий Алексеевич — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, проректор по развитию и инновациям, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва

Бабарина Мария Борисовна — к. м. н., с. н. с. ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России; Москва

Васильева Елена Ивановна — к. б. н., заведующая бактериологической лабораторией НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД», Москва

Особенности микробного пейзажа и антимикробной химиотерапии у больных нелактационным маститом

*К. В. ЛИПАТОВ¹, Е. А. КОМАРОВА¹, М. А. МИРСКАЯ², В. И. ХРУПКИН¹, М. А. КИРЮПИНА¹

¹ Первый московский медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

² Городская клиническая больница им. И. В. Давыдовского, Москва

Features of Microbial Landscape and Antimicrobial Chemotherapy in Patients with Non-Lactational Mastitis

*K. V. LIPATOV¹, E. A. KOMAROVA¹, M. A. MIRSKAYA², V. I. KHRUPKIN¹, M. A. KIRYUPINA¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

² City Clinical Hospital №23 n.a. I.V. Davydovsky

Проанализированы результаты микробиологического обследования 336 пациенток с различными формами нелактационного мастита. Возбудитель идентифицирован у 321 (95,5%) больных. Чаще всего выделялась монокультура — 84,4% наблюдений, микробные ассоциации встречались в 15,6% случаев. Преобладал золотистый стафилококк — 69,7% пациенток. Видовой состав микрофлоры зависел от формы заболевания: при острой форме нелактационного мастита *Staphylococcus aureus* был выделен в 86,1% случаев, при подострой и хронической — 69,8 и 57,4%, соответственно, при этом возрастала роль грамотрицательных микроорганизмов и микробных ассоциаций. Частота выделения полиантибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов зависела от длительности заболевания, предшествующего приема антибактериальных препаратов и формы клинического течения. При острых формах нелактационного мастита метициллинорезистентный золотистый стафилококк (MRSA) был выделен всего в 2% случаев среди всех *S.aureus*, при подостром же и хроническом течении заболевания частота его выделения резко возрастала до 11,7 и 23,4%, соответственно, среди всех стафилококков. Микробиологический мониторинг раневого отделяемого при лечении пациенток с нелактационным маститом в сочетании с рациональной антибактериальной терапией и адекватным хирургическим вмешательством являются залогом успешного лечения данной категории больных.

Ключевые слова: нелактационный мастит, возбудители, антибиотикорезистентность.

The article analyzes the results of a microbiological examination of 336 patients with various forms of non-lactating mastitis. The causative agent was identified in 321 (95.5%) patients. Monoculture was identified in the majority of observations (84.4%), microbial associations were found in 15.6% of cases. *Staphylococcus aureus* had prevailed as the causative agent (69.7% of cases). Microflora composition depended on the form of the disease: *S.aureus* was isolated from the samples in 86.1% of cases of acute form of non-lactating mastitis, in 69.8% of cases of subacute form, and in 57.4% of patients with chronic form of non-lactating mastitis. The role of gram-negative microorganisms and microbial association is constantly evolving. The frequency of isolation of multiple antibiotic-resistant strains of microorganisms depended on the duration of the disease, the previous intake of antibacterial drugs and the clinical course of the disease. In acute forms of non-lactating mastitis methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) was isolated in only 2% of cases among all isolated *S.aureus*, while in subacute and chronic forms of the disease the frequency of MRSA isolation dramatically increased to 11.7% and 23.4% of all strains of staphylococci, respectively. Microbiological monitoring of wound fluid in the treatment of patients with non-lactating mastitis in combination with rational antibiotic therapy and adequate surgical intervention is the key to successful treatment of this category of patients.

Keywords: non-lactating mastitis, pathogens, antibiotic resistance.

Введение

Последние годы характеризуются значительным увеличением числа больных нелактационным маститом, который сегодня встречается значительно чаще воспалительного процесса, возникающего в лактирующей молочной железе [1–3]. Известно, что, как правило, нелактационный мастит развивается на фоне непролиферативных форм фиброзно-кистозной мастопатии, что опре-

деляет ряд особенностей его хирургического лечения [4, 5]. Однако, несмотря на значимость хирургического вмешательства, важную роль в лечении этого заболевания играет антимикробная химиотерапия, которая, в свою очередь, базируется на результатах проведенного микробиологического исследования [6, 7]. Микробиологический мониторинг при нелактационном мастите приобретает неопределимую роль в связи с преобладающим подострым и хроническим течением патологического процесса, повторными курсами антибактериальной терапии, высоким процентом рецидивов после хирургического лечения [8–12]. К настоящему времени опубликовано явно недостаточное коли-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: E-mail: k_lipatov@mail.ru

чество данных, анализирующих микробный пейзаж в очаге воспаления у заболевших нелактационным маститом, а также его взаимосвязь с различными клинико-морфологическими формами этого заболевания [13–18]. Вопросы антибактериальной терапии нелактационного мастита также не нашли необходимого отражения в литературе. Все это в совокупности ухудшает результаты лечения пациенток и определяет необходимость проведения дальнейших исследований.

Цель исследования — анализ микробного пейзажа в очаге инфекции и микробиологический мониторинг при лечении различных форм нелактационного мастита. Исследованию подвергался интраоперационно забранный материал.

Материал и методы

Проанализированы результаты микробиологического обследования 336 пациенток с нелактационным маститом, находившихся на лечении в клинике в период с 2010 по 2016 гг. Все больные были госпитализированы в экстренном или плановом порядке с различными клиническими и клинико-морфологическими формами заболевания. Возраст заболевших составил от 18 до 72 лет, при этом наибольшее число женщин — 46,4% — находилось в предменопаузальном периоде. Это согласуется с известным фактом о том, что нелактационный мастит обычно развивается на фоне фиброзно-кистозной мастопатии — заболевании, которое чаще всего встречается в пременопаузе [4, 5]. Длительность заболевания варьировала от нескольких дней до многих месяцев. При этом острые клинические формы встречались реже — 36%, чем подострые и хронические — 64% наблюдений. При этом большинство пациенток на догоспитальном этапе наблюдались у хирурга или маммолога и получали консервативное лечение в виде перорального приёма различных антибактериальных препаратов (чаще всего это были препараты широкого спектра действия — пенициллины, макролиды, фторхинолоны). 48 (14,3%) пациенток были ранее уже оперированы по поводу нелактационного мастита той же локализации. Они были госпитализированы в связи с рецидивом гнойного процесса. Несмотря на то, что основным методом лечения гнойного нелактационного мастита является хирургический, крайне важное значение придавали антибактериальной терапии, которая основывалась на результатах микробиологического исследования раневого экссудата. Материал забирали интраоперационно. Исследование включало в себя качественный и количественный анализ бактериальной флоры и определение её чувствительности к антибиотикам. С этой целью применяли диско-диффузионный метод. Для идентификации возбудителя раневого экссудата со стенок операционной раны собирали стерильными дакроновыми тампонами. Затем тампон с отделяемым с целью его разведения до 10^{-2} взбалтывали в 5 мл сахарного бульона. Далее полученную взвесь высевали в количестве 0,1 мл на чашки Петри агаром Эндо и колумбийским агаром + 5% бараньей крови. Инкубация чашек Петри с солевым и эндо

агаром проводилась при температуре +37°C в течение 18–24 ч. Чашки Петри с колумбийским агаром инкубировались в CO₂ термостате при параметрах T+37°C, 5% CO₂ в течение 24–48 ч. По истечении этого времени в каждой чашке проводился подсчёт числа выросших колоний и идентификация каждого вида возбудителя.

Количественное определение содержания микробных тел в 1 г ткани проводили по методу С. Baxter (1973) и Е. Loeble (1974) в модификации И. И. Колкера (1981). С этой целью во время хирургического вмешательства из удалённой ткани молочной железы готовили кусочек массой 1 г. Затем его гомогенизировали и из полученной массы готовили 10, 100 и 1000-кратные разведения, которые в объёме 0,2 мл высевали на чашки Петри. Их инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре +37°C. В дальнейшем выполняли подсчет выросших колоний, а количество бактерий в 1 г ткани рассчитывали по формуле:

$$H = A \times 5 \times X,$$

где H — количество бактерий в 1 грамме ткани, A — число выросших колоний, 5 — число перерасчёта, X — число разведений.

Результаты исследования

Идентифицировать возбудителя заболевания и изучить его чувствительность к антибиотикам удалось у 321 (95,5%) пациенток. Оставшиеся посевы роста микрофлоры не обнаружили. Возможно, в этих случаях имела место анаэробная микрофлора, идентификация которой не производилась, или наблюдались дефекты в заборе биологического материала. Если рассматривать группу пациенток в целом, то чаще всего из очагов инфекции выделялась монокультура — 271 (84,4%) наблюдение. Ассоциации нескольких микроорганизмов встречались значительно реже — 50 (15,6%) случаев. Если анализировать видовой состав микроорганизмов, то в посевах преобладал золотистый стафилококк — 224 (69,7%) больных. Другая кокковая грамположительная флора и грамотрицательные микроорганизмы регистрировались значительно реже (табл. 1).

Более детальный анализ микробного пейзажа очагов инфекции показал, что значительное влияние на видовой состав микрофлоры оказывал клинический вариант течения заболевания, его длительность, а также характер предшествующего амбулаторного и стационарного лечения. И если при острой форме нелактационного мастита *S.aureus* был выделен в 86,1% случаев, то при подострой и хронической — значительно реже: 69,8 и 57,4%, соответственно. Частота же высевания грамотрицательных микроорганизмов и микробных ассоциаций значительно возрастала (табл. 2).

Таблица 1. Общая характеристика микробного пейзажа у больных нелактационным маститом

Возбудитель	Число больных	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	224	69,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	37	11,5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	31	9,6
<i>Escherichia coli</i>	29	9,0
<i>Proteus</i> spp.	27	8,4
<i>Klebsiella</i> spp.	18	5,6
<i>Acinetobacter</i> spp.	5	1,6
Ассоциации микроорганизмов	50	15,6

Таблица 2. Зависимость микробного пейзажа в очаге инфекции от варианта клинического течения нелактационного мастита

Возбудитель	Вариант клинического течения		
	острый мастит (n=115)	подострый мастит (n=159)	хронический мастит, в том числе со свищом (n=47)
<i>Staphylococcus aureus</i>	99 (86,1%)	111 (69,8%)	27 (57,4%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (4,3%)	25 (15,7%)	4 (8,5%)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4 (3,5%)	14 (8,8%)	7 (14,9%)
<i>Escherichia coli</i>	2 (1,7%)	13 (8,2%)	9 (19,1%)
<i>Proteus</i> spp.	3 (2,6%)	14 (8,8%)	7 (14,9%)
<i>Klebsiella</i> spp.	2 (1,7%)	8 (5%)	6 (12,8%)
<i>Acinetobacter</i> spp.	—	—	5 (10,6%)
Ассоциации микроорганизмов	0	26 (16,4%)	18 (38,3%)

Таблица 3. Частота выделения полиантибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов при различных вариантах клинического течения нелактационного мастита

Возбудитель	Вариант клинического течения		
	острый мастит	подострый мастит	хронический мастит, в том числе со свищом
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	2%	11,7%	23,4%
<i>Escherichia coli</i> (БЛРС)	0	23,1%	44,4%
<i>Proteus</i> spp. (БЛРС)	0	14,3%	28,6%
<i>Klebsiella</i> spp. (БЛРС)	0	12,5%	16,7%
<i>Acinetobacter</i> spp.	0	0	100%

Примечание. MRSA — метициллинорезистентный золотистый стафилококк; БЛРС — бета-лактамазы расширенного спектра.

Таблица 4. Характеристика антибиотикочувствительности выделенных бактерий

Антибиотик	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i> (MRSA)	<i>S.epider- midis</i>	<i>S.pyoge- nes</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i> (БЛРС)	<i>Proteus</i> spp.	<i>Proteus</i> spp. (БЛРС)	<i>Klebsi- ella</i> spp.	<i>Klebsi- spp. (БЛРС)</i>	<i>Acinetoba- cter</i> spp.
Оксациллин	S	R	S	S	R	—	R	—	R	—	R
Цефазолин	S	R	S	S	S	—	S	—	S	—	R
Линкомицин	S	R	S	S	R	—	R	—	R	—	R
Ванкомицин	S	S	S	S	R	—	R	—	R	—	R
Линезолид	S	S	S	S	R	—	R	—	R	—	R
Гентамицин	—	R	—	S	S	—	S	R	S	R	R
Амикацин	—	R	—	—	S	I	S	S	S	I	R
Ципрофлоксацин	—	R	—	S	S	R	S	I	S	R	R
Цефоперазон	—	R	—	—	S	R	S	R	S	R	I
Имипенем	—	R	—	—	S	S	S	S	S	S	S
Меропенем	—	R	—	—	S	S	S	S	S	S	S

Примечание. MRSA — метициллинорезистентный золотистый стафилококк; БЛРС — бета-лактамазы расширенного спектра; S — высокая чувствительность; I — умеренная устойчивость; R — резистентность; «—» — чувствительность не изучалась.

Acinetobacter spp., относящийся к группе неферментирующих бактерий, обнаруживали только у ранее оперированных больных, что позволило считать его результатом возникновения внутрибольничной инфекции на предыдущих этапах лечения пациенток.

Проведённое изучение антибиотикочувствительности бактерий показало, что частота выделения полиантибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов зависела от длительности заболевания, предшествующего приёму антибактериальных препаратов и формы клинического течения. При острых формах нелактационного мастита метициллинорезистентный золотистый стафилококк (MRSA), который, как известно, отличается полиантибиотикорезистентностью, был выделен всего в 2% случаев среди всех найденных *S.aureus*. При подостром же и хроническом течении заболевания частота его выделения резко возрас-
та до 11,7 и 23,4%, соответственно, среди

всех стафилококков. Анализ историй болезни этих пациенток показал, что все они на догоспитальном или предшествующем стационарном лечении получали различные антибактериальные препараты. В противовес этому, *Streptococcus pyogenes*, также один из наиболее часто выделяемых микроорганизмов, во всех случаях отличался хорошей чувствительностью к антибиотикам и отсутствием резистентных форм. Антибиотикочувствительность грамотрицательных микроорганизмов также снижалась при хронических и рецидивирующих формах мастита в условиях предшествующего безуспешного консервативного лечения антибактериальными препаратами (табл. 3).

Сводные данные по антибиотикочувствительности выделенных бактерий представлены в табл. 4. Как видно из табл. 4, метициллинорезистентный золотистый стафилококк во всех случаях сохранял высокую чувствительность к ванкомицину и линезолиду. Ванкомицинорезистентные его штаммы за-

регистрированы не были. Идентифицированный во всех 5 случаях *Acinetobacter* spp. отличался полиантибиотикорезистентностью, сохраняя при этом чувствительность к карбапенемам. Аналогичная ситуация отмечена и у энтеробактерий, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра. Гарантированная активность у энтеробактерий проявляется только у карбапенемов.

Заключение

Наиболее частым возбудителем нелактационного мастита является золотистый стафилококк, частота выделения которого несколько уменьшается при подострых и хронических формах заболе-

вания при одновременном увеличении грамотрицательных микроорганизмов и микробных ассоциаций. Значительное увеличение числа антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов в очаге при подострых и хронических формах нелактационного мастита вероятнее всего связано с длительным безуспешным приёмом антибактериальных препаратов на предыдущих этапах лечения. Микробиологический мониторинг раневого отделяемого при лечении пациенток с нелактационным маститом в сочетании с рациональной антибактериальной терапией и адекватным хирургическим вмешательством являются основой успешного лечения этой непростой категории больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евскина Е.В., Кокорин К.В., Соколова И.А. Анализ особенностей клинического течения лактационных маститов в зависимости от сроков их возникновения. Материалы международной научно-практической конференции «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых». — 2017. — С. 83–85. / *Evskina E.V., Kokorin K.V., Sokolova I.A. Analiz osobennostey klinicheskogo techeniya laktatsionnykh mastitov v zavisimosti ot srokov ikh vozniknoveniya. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Khirurgicheskie infektsii kozhi i myagkikh tkanej u detej i vzroslykh».* — 2017; 83–85. [in Russian]
2. Котов И.И., Бублейник О.А., Кацовский А.М. Современный взгляд на лечение лактационного мастита. Материалы международной научно-практической конференции «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых». — 2017. — С. 141–142. / *Kotov I.I., Bublejnik O.A., Katsovskij A.M. Sovremennyy vzglyad na lechenie laktatsionnogo mastita. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Khirurgicheskie infektsii kozhi i myagkikh tkanej u detej i vzroslykh».* 2017; 141–142. [in Russian]
3. Amir J. Breastfeeding and *Staphylococcus aureus*: three case reports. *Breastfeed Rev.* 2002; 10: 1: 15–18.
4. Горайнова Л.К. Мастопатия. Особенности патогенеза и лечения на современном этапе. Поликлиника. — 2011. — № 3. — С. 106–111. / *Gorajnova L.K. Mastopatiya. Osobennosti patogeneza i lecheniya na sovremennom etape. Poliklinika* 2011; 3: 106–111. [in Russian]
5. Корженкова Г.П. Фиброзно-кистозная мастопатия вариант нормы или болезнь? Онкогинекология. — 2012. — № 3. — С. 46–54. / *Korzhenkova G.P. Fibrozno-kistochnaya mastopatiya variant normy ili bolezny? Onkoginekologiya* 2012; 3: 46–54. [in Russian]
6. Зузова А.П., Тарасов А.А. Современные тенденции в клинике хирургических инфекций кожи и мягких тканей. Материалы международной научно-практической конференции «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых». — 2017. — С. 93–94. / *Zuzova A.P., Tarasov A.A. Sovremennyye tendentsii v klinike khirurgicheskikh infektsij kozhi i myagkikh tkanej. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Khirurgicheskie infektsii kozhi i myagkikh tkanej u detej i vzroslykh».* 2017; 93–94. [in Russian]
7. Журнадежянц В.А., Кибеков Э.А., Сердюков М.А., Шихрагимов М.И. Современные методы комплексного лечения гнойных заболеваний кожи и подкожной жировой клетчатки в условиях хирургического отделения. Материалы 3-го Международного конгресса «Раны и раневые инфекции», посвященного 100-летию со дня рождения М.И.Кузина. — 2016. — С. 124–125. / *Zurnadzh'yants V.A., Khibekov E.A., Serdyukov M.A., Shikhragimov M.I. Sovremennyye metody kompleksnogo lecheniya gnojnykh zabolevaniy kozhi i podkozhnoy zhirovoy kletchatki v usloviyakh khirurgicheskogo otdeleniya. Materialy 3-go Mezhdunarodnogo kongressa «Rany i ranevye infektsii», posvyashchenno-go 100-letiyu so dnya rozhdeniya M.I.Kuzina.* 2016; 124–125. [in Russian]
8. Белятич Л.И., Ключева Е.В. Этиология инфекции кожи и мягких тканей. Антибиотикорезистентность микробиоты у больных гнойной хирургии. Материалы международной научно-практической конференции «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых». — 2017. — С. 25–27. / *Belyatich L.I., Klyueva E.V. Etiologiya infektsii kozhi i myagkikh tkanej. Antibiotikorezistentnost' mikrobioty u bol'nykh gnojnoj khirurgii. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Khirurgicheskie infektsii kozhi i myagkikh tkanej u detej i vzroslykh».* 2017; 25–27. [in Russian]
9. Дерябин Д.Г., Курлаев В.К. Роль стафилококков в возникновении, развитии и хронизации лактационных маститов. Журнал микробиологии. — 2000. — № 2. — С. 118–121. / *Deryabin D.G., Kurlaev V.K. Rol' stafilokokkov v vozniknovenii, razviti i khronizatsii laktatsionnykh mastitov. Zhurnal mikrobiologii* 2000; 2: 118–121. [in Russian]
10. Branch-Elliman W., Golen T.H., Gold H.S. Risk factors for *Staphylococcus aureus* postpartum breast abscess. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 71–77.
11. Chen C.Y., Anderson B.O., Lo S.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections may not impede the success of ultrasound-guided drainage of puerperal breast abscesses. *J Am Coll Surg* 2010; 210: 148–154.
12. Jahanfar S.Э., Teng C.L. Antibiotics for mastitis in breastfeeding women. *San Paulo Med J* 2016; 134 (3): 273.
13. Федосеев А.В., Муравьев С.Ю., Петрова Д.А., Зацаринный В.В. Микрофлора и её резистентность к антибиотикам у больных в гнойной хирургии. Материалы 3-го Международного конгресса «Раны и раневые инфекции», посвящённого 100-летию со дня рождения М.И.Кузина. 2016. — С. 314–316. / *Fedoshev A.V., Murav'ev S.YU., Petrova D.A., Zatsarinnyy V.V. Mikroflora i ee rezistentnost' k antibiotikam u bol'nykh v gnojnoj khirurgii. Materialy 3-go Mezhdunarodnogo kongressa «Rany i ranevye infektsii», posvyashchenno-go 100-letiyu so dnya rozhdeniya M.I.Kuzina.* 2016; 314–316. [in Russian]
14. Dabbas N., Chand M., Pallett A. Have the organisms that cause breast abscess changed with time? — Implications for appropriate antibiotic usage in primary and secondary care. *Breast J* 2010; 16: 412–415.
15. Perales Palacios I. Diagnostic microbiology in mastitis. What do we know about counts and significant microorganisms? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 7: 156–168.
16. Perez A., Orta L., Padilla E. CA-MRSA puerperal mastitis and breast abscess: A potential problem emerging in Europe with many unanswered questions *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 949–951.
17. Rodvold K.A., McConeghy K.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: Past, present, and future. *Clin Infect Dis* 2014; 58 (Suppl 1): 20–27.
18. Yu H.J., Deng H., Ma J., Huang S.J., Yang J.M., Huang Y.F. et al. Clinical metagenomic analysis of bacterial communities in breast abscesses of granulomatous mastitis. *Int J Infect Dis* 2016; 53: 30–33.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Липатов Константин Владимирович — д. м. н., профессор кафедры общей хирургии Первого Московского медицинского университета им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

Комарова Елена Александровна — к. м. н., ассистент кафедры общей хирургии Первого Московского медицинского университета им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

Мирская Мария Александровна — врач-микробиолог, Городская клиническая больница им. И. В. Давыдовского, Москва

Хрупкин Валерий Иванович — д. м. н., профессор кафедры общей хирургии Первого Московского медицинского университета им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

Кирипина Мария Андреевна — студентка 4 курса лечебного факультета Первого Московского медицинского университета им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

Влияние генетического полиморфизма генов ферментов, ответственных за биотрансформацию противотуберкулёзных препаратов на риск развития гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом

А. В. КАЗАКОВ¹, Г. Н. МОЖОКИНА¹, В. А. АКСЕНОВА¹, С. В. СМЕРДИН²,
С. А. ПОПОВ¹, Н. И. КЛЕВНО¹, А. А. РАГИМОВ³, О. Е. КУЗНЕЦОВ³, В. В. КОЗЛОВ³

¹ Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний МЗ РФ, Москва

² Московский областной противотуберкулёзный диспансер, Москва

³ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

Effect of Genetic Polymorphism of the Enzyme Genes Responsible for Biotransformation of Antituberculous Drug on the Risk of Hepatotoxic Reaction in Patients with Tuberculosis

A. V. KAZAKOV¹, G. N. MOZHOKINA¹, V. A. AKSENOVA¹, S. V. SMERDIN²,
S. A. POPOV¹, N. I. KLEVNO¹, A. A. RAGIMOV³, O. E. KUZNETZOV³, V. V. KOZLOV³

¹ National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow

² Moscow Regional Antituberculous Dispensary, Moscow

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Цель — повысить эффективность и безопасность химиотерапии больных туберкулёзом возможно на основе знания генотипических характеристик пациента с помощью молекулярно-генетических методов исследования. **Материал и методы:** всего в исследовании приняли участие 95 человек в возрасте от 12 до 50 лет. В схеме лечения у пациентов основной группы применялись препараты изониазид, пирразинамид и рифампицин. Побочные гепатотоксические реакции в виде клинических проявлений и (или) повышения уровня АлАТ и АсАТ наблюдались у 23 пациентов. Гепатопротективную терапию препаратами карсил, фосфоглив получали все пациенты. Для проведения лабораторных исследований брали цельную кровь, проводилось выделение геномной ДНК и постановка полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В исследуемой группе, в качестве возможных предикторов гепатотоксичности рассматривалось наличие генотипов, относящихся к генам: rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, rs1045642, rs74837985. Для прогнозирования развития гепатотоксичности при применении противотуберкулёзных препаратов в зависимости от наличия или отсутствия в геноме обследуемого определённых генотипов использовался метод логистического регрессионного анализа. **Результаты:** при проведении логистического регрессионного анализа были получены 2 статистически значимые модели. Первая модель отражает ассоциированность с гепатотоксичностью противотуберкулёзных препаратов генотипа AA гена rs1799931 и генотипов AA и AG (аллеля A) гена rs1799930. Вторая модель отражала связь проявления гепатотоксичности противотуберкулёзных препаратов с генотипами TT и CT (аллеля T) гена rs1041983. **Выводы:** наличие генотипа AA гена rs1799931 и генотипов AA и AG (аллеля A) гена rs1799930, а также присутствие генотипов TT или CT (аллеля T) гена rs1041983, определяющих активность фермента NAT2 статистически значимо увеличивают риск гепатотоксичности при приёме противотуберкулёзных препаратов у больных туберкулёзом лёгких.

Ключевые слова: туберкулёз, полиморфизм генов, гепатотоксические реакции, противотуберкулёзные препараты.

Purpose of the study: To increase the effectiveness and safety of chemotherapy for tuberculosis patients based on knowledge of patient's genotypic characteristics through molecular genetic methods of research. **Methods:** A total of 95 people aged 12 to 50 took part in the study. In the treatment regimen, the patients of the main group were treated with isoniazid, pyrazinamide and rifampicin. Adverse hepatotoxic reactions in the form of clinical manifestations and (or) increase in the level of ALT and AST were observed in 23 patients. Hepatoprotective therapy with drugs Carsil, Phosphogliv was received by all patients. To conduct laboratory tests, genomic DNA was isolated from whole blood and the polymerase chain reaction was performed in real time. In the study group the presence of genotypes belonging to the genes listed below was considered as possible predictors of hepatotoxicity: rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, rs1045642, rs74837985. To predict the development of hepatotoxicity with the use of antituberculosis drugs, the method of logistic regression analysis was used depending on the presence or absence of specific genotypes in the genome of the examinee. **Results:** As a result of the logistic regression analysis two statistically significant models were obtained. The first model reflects the association of the antituberculosis drugs hepatotoxicity with the AA genotype of the rs1799931 gene and the AA and AG (allele A) genotypes of the rs1799930 gene. The second model reflects the connection of the antituberculosis drugs hepatotoxicity manifestation with the TT and CT (allele T) genotypes of the rs1041983 gene. **Conclusions:** The presence of the AA genotype of the rs1799931 gene and the AA and AG (allele A) genotypes of the rs1799930 gene as well as the presence of the TT or CT (allele T) genotype of the rs1041983 gene, which determine the activity of the NAT2 enzyme, significantly increases the risk of hepatotoxicity during therapy with antituberculosis drugs in patients with pulmonary tuberculosis.

Keywords: tuberculosis, gene polymorphism, hepatotoxic reactions, antituberculous drugs.

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 127473 Москва, ул. Достоевского, дом 4 кор. 2. НМИЦ ФПИ

Введение

В последнее десятилетие в Российской Федерации отмечается значительное снижение показателя заболеваемости туберкулёзом и улучшение эпидемиологической обстановки. Однако показатели эффективности химиотерапии больных туберкулёзом остаются достаточно низкими. Так, клиническое излечение отмечается лишь у 46% впервые выявленных больных [1]. Одной из причин недостаточно высокой эффективности лечения являются нежелательные побочные реакции (НПР) на противотуберкулёзные препараты (ПТП), при развитии которых нарушается полноценный курс химиотерапии и повышается риск формирования устойчивости возбудителя к препаратам. Поражение печени является самой распространённой НПР, так как печень является центральным органом для биотрансформации и выведения большинства ксенобиотиков. Частота гепатотоксических реакций у впервые выявленных больных может достигать 60% [2].

Для лечения впервые выявленных больных используются 4 ПТП основного ряда, среди которых изониазид и рифампицин являются самыми эффективными по отношению к микобактериям туберкулёза (при сохранённой лекарственной чувствительности возбудителя). В условиях комплексной химиотерапии непросто выявить препарат, ответственный за развитие гепатотоксических реакций. На протяжении многих лет изониазид рассматривался как основная причина гепатотоксических реакций во время лечения больных туберкулёзом. Тяжёлые поражения печени от применения изониазида в 70 годах прошлого века даже были признаны основной причиной смерти у нескольких больных туберкулёзом [3]. В настоящее время частота гепатотоксических реакций на изониазид может достигать 30% в различных популяциях [4], что обусловлено, в первую очередь, генетическими факторами, которые определяют активность и полноценность функционирования ферментов, участвующих в биотрансформации изониазида [5].

Наиболее часто гепатотоксические реакции связывают с рифампицином [2], что обусловлено особенностями его метаболизма. Рифампицин является индуктором экспрессии ряда ферментов, осуществляющих реакцию окисления целого ряда лекарственных средств в микросомах гепатоцитов и обладает свойствами самоиндукции, ускоряя собственную биотрансформацию. Установлено, что вариабельность фармакокинетики рифампицина (скорость его экскреции) ассоциирована с фенотипом ацетилирования изониазида [6].

Метаболизм изониазида осуществляется, в основном, N-ацетилтрансферазой 2 типа (NAT2) до ацетилизониазида, далее до ацетилгидразина и нетоксичного диацетилгидразина. Этот фермент

кодируется геном NAT2, который определяет его активность. При недостаточной активности фермента или при избытке препарата из изониазида путём гидролиза образуется токсичный гидразин, который так же под воздействием NAT2 подвергается ацетилизации с образованием ацетилгидразина [7–9].

Полиморфизм гена NAT2 лежит в основе выделения трёх основных генетически обусловленных фенотипов: быстрых, промежуточных и медленных ацетиляторов [10–13]. Семь вариантов гена с олигонуклеотидными последовательностями 191 G>A, 282 C>T, 341 T>C, 481 C>T, 590 G>A, 803 A>G и 857 G>A связаны с фенотипом медленных ацетиляторов [14]. Связь медленного фенотипа ацетилирования с повышенным риском развития гепатотоксических реакций установлена в ряде исследований в разных человеческих популяциях [15–17].

Помимо ацетилирования, продукт метаболизма изониазида — ацетилгидразин может окисляться ферментом цитохромом P4502E1 до токсичных промежуточных продуктов (ацетилдиазен, кетены). Эти метаболиты могут разрушать гепатоциты за счёт нарушения клеточного гомеостаза или, связываясь с белками плазмы на поверхности гепатоцитов, действовать как гаптены и вызывать аутоиммунные реакции [5].

Активность CYP2E1 также определяется полиморфизмом гена CYP2E1 в нескольких участках генома [18]. Однако чёткой ассоциации генотипов CYP2E1 с риском возникновения поражения печени изониазидом не доказано, что требует дальнейших исследований в различных популяциях и с большим размером выборки [19].

Фермент Глутатион-S-трансфераза (GST) обеспечивает важный этап детоксикации этих промежуточных гепатотоксинов путём их конъюгации с глутатионом [20], активность которого контролируется генами семейства растворимых (или цитозольных) GST. С наличием нулевых генотипов GSTM1 и GSTT1 связывают предрасположенность к развитию гепатотоксичности, вызванной ксенобиотиками [21, 22]. Однако в последних исследованиях в бразильской, индийской и китайской популяции [23, 24] данной ассоциации не установлено.

Таким образом, для обеспечения нормального метаболизма изониазида необходимо полноценное функционирование системы ферментов, обеспечивающих ацетилирование (NAT2), окисление (CYP2E1) и конъюгацию (GST). По результатам метаанализа (2012 г.) изучения фармакогенетики лекарственного метаболизма ПТП и их взаимосвязь с гепатотоксическими реакциями было продемонстрировано следующее: «медленный» генотип NAT2, наличие мутаций типа CYP2E1*1A и отсутствие мутаций в GSTM1 зна-

чительно увеличивает риск повреждения печени [25]. Однако эти исследования были выполнены в популяциях Азии, Индии, Северо-Восточной Африки, Южной Америки. На европейской популяции, в том числе на территории России, такие исследования не проводились.

Цель исследования — установить взаимосвязь генетического полиморфизма ферментов, ответственных за метаболизм изониазида и других ПТП, с риском развития гепатотоксических реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулезом.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 95 человек. 17 практически здоровых составили контрольную группу; 78 впервые выявленных больных — основную.

В основной группе было 38 лиц мужского пола и 40 женского. По возрастному составу: 50 пациентов были в возрасте от 25 до 65 лет, 28 — дети и подростки в возрасте от 5 до 16 лет. В контрольной группе было 5 мужчин и 12 женщин в возрасте от 35 до 60 лет.

Основной схемы лечения у пациентов основной группы были препараты изониазид, рифампицин и пиразинамид. Переносимость лечения оценивали по клиническим признакам (диспепсические симптомы, болезненность при пальпации в области живота), которые учитывали ежедневно, и лабораторным показателям (общий анализ крови, биохимический анализ крови), которые определяли 1 раз в месяц или чаще (по показаниям).

Гепатотоксические реакции фиксировали при наличии клинических проявлений (тошнота, рвота) и (или) изменений лабораторных показателей крови (повышение билирубина, АЛТ и АсАТ более 2 норм). Статистическую обработку материалов проводили по *t*-критерию Стьюдента, а оценку значимости различий в зависимости от воздействия фактора риска оценивали с помощью критерия Хи-квадрат с поправкой Йейтса.

Методы исследования. Лабораторные исследования крови выполнялись на автоматическом гематологическом анализаторе «SYSMEX KX-21» и на автоматическом клиническом анализаторе «SAPPHIRE 400» с использованием реагентов для диагностики «Human».

Для проведения генетических исследований брали цельную кровь в пробирку с ЭДТА. Образцы цельной крови замораживали и хранили при температуре -30°C до проведения анализа.

На первом этапе работы проводилось выделение геномной ДНК с помощью наборов реагентов Arrow Blood DNA 500 из цельной крови (на станции NorDiag Arrow). Для оценки качества и количества нуклеиновых кислот использовали спектрофотометр Biowave DNA. Выход ДНК определялся, исходя из её концентрации, рассчитанной на основании поглощения, измеренного при 260 нм. Чистота определялась с помощью расчёта отношения поглощения, измеренного при 260 нм и 280 нм, и в нашем исследовании чистота ДНК колебалась в интервале 1,7—1,9.

Далее проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе CFX-96 (BIO-RAD) с использованием наборов реагентов для генотипирования SNPs TaqMan по 9 точкам: C_572771_10, C_572770_20, C_1204091_10, C_1204092_20, C_1204093_20, C_572769_20, C_8684085_20, C_7586657_20, C_44202997_20. Постановка проводилась согласно протоколу производителя реагентов. Все исследуемые образцы содержали ДНК в концентрации 5 нг на реакцию для получения достоверных и воспроизводимых результатов с четкой кластеризацией.

Результаты исследований анализировали с помощью программного обеспечения по двум каналам VIC и FAM.

В исследуемой группе в качестве возможных предикторов гепатотоксических реакций определяли наличие генотипов гена NAT2: rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, rs1045642 и гена GSTM1 (rs74837985).

Для прогнозирования развития гепатотоксичности при применении противотуберкулёзных препаратов в зависимости от наличия или отсутствия в геноме пациента определённых генотипов использовали метод логистического регрессионного анализа. В качестве отклика рассматривалась бинарная переменная, где 0 — отсутствие гепатотоксичности (CCU), 1 — её наличие.

Модель логистической регрессии представлена в виде зависимости логарифма шанса наступления прогнозируемого события (логита) от линейной комбинации факторных переменных, и может быть выражена следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)}}$$

где, p — вероятность прогнозируемого события;

e — математическая константа 2,72;

b_0 — константа модели;

b_1 — коэффициент при предикторной переменной x_1 , показывающий изменение логарифмических шансов, вызванное единичным изменением независимых переменных;

n — порядковый номер предиктора, включённого в уравнение.

Проводилось построение моделей логистической регрессии с поочередным включением каждого предиктора. Построение логистической регрессионной модели осуществляли методом пошагового включения прогностических факторов с оценкой значения коэффициента детерминации R^2 , показывающего долю влияния всех предикторов модели на дисперсию зависимой переменной.

Проверка статистической значимости модели осуществлялась при помощи критерия χ^2 . При значении $p < 0,05$, гипотеза о незначимости модели отвергалась.

Соответствие модели использованным данным характеризовали с помощью критерия согласия Хосмера—Лемешева. При $p > 0,05$ принималась гипотеза о согласованности модели.

Интерпретация параметров логистической регрессии производилась на основе величины $\exp(b)$. При положительном коэффициенте b , $\exp(b)$ больше 1, указывает на повышение шансов наступления прогнозируемого события. Если коэффициент b — отрицательный, $\exp(b)$ меньше 1, то шансы наступления события снижаются.

Чувствительность и специфичность предикторов оценивали при помощи ROC-анализа. Количественная интерпретация результатов проводилась по ROC-кривым с оценкой показателя AUC (Area under ROC curve — площадь под ROC-кривой).

Результаты исследования

В основной группе пациентов, получающих лечение противотуберкулёзными препаратами гепатотоксические реакции наблюдались у 23 из 78 (29,5%). Большинство реакций зафиксировано среди взрослых пациентов — у 17 из 50 (34,0%). Среди детей частота развития НПР составила 21,4% (у 6 из 28). Однако статистически значимых различий по частоте возникновения НПР среди детей и взрослых не отмечено ($\chi^2 = 0,827$, $p > 0,05$).

По гендерному признаку достоверных различий в частоте возникновения НПР не выявлено:

26,3% у лиц мужского пола и 32,5% у лиц женского пола ($\chi^2=0,123$, $p>0,05$). Однако в некоторых исследованиях женский пол рассматривается как фактор риска развития гепатотоксических реакций [2].

У 14 из 23 (60,8%) пациентов гепатотоксические реакции проявлялись в виде изменений лабораторных показателей: повышение АлАТ и АсАТ более 2 норм. Гепатотоксические реакции у 9 (38,2%) пациентов проявлялись в виде клинических симптомов (диспепсические явления, болезненность при пальпации в области живота) и изменений лабораторных показателей.

Гепатотоксические реакции у 15 (65,2%) из 23 пациентов носили устранимый характер, купировались дополнительным назначением гепатопротекторов и не потребовали отмены ПТП. У 8 (34,8%) пациентов гепатотоксические реакции потребовали отмены рифампицина и (или) изониазида, изменения схемы лечения, и назначения дезинтоксикационной и гепатопротективной терапии. В качестве гепатопротекторов использовали гептрал, эссенциале, фосфоглив.

Для выявления возможных предикторов гепатотоксических реакций определяли наличие генотипов генов NAT2: rs1801279, rs1799931, rs1799930, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1041983, rs1045642. Так же в качестве возможного предиктора рассматривались мутации гена GSTM1 (rs74837985).

При проведении логистического регрессионного анализа были получены 2 статистически значимые модели.

Первая модель отражает ассоциированность с гепатотоксичностью противотуберкулёзных препаратов генотипа AA гена rs1799931 и генотипов AA и AG (аллеля А) гена rs1799930. Данная модель представлена следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(4,114 + 1,075 x_1 + 1,088 x_2)}}$$

где:

p — вероятность развития гепатотоксичности;

x_1 — наличие генотипа AA гена rs1799931 (Exp(b)= 2,930, ДИ 95% 1,163—7,385);

x_2 — наличие генотипов AA или AG (аллеля А) гена rs1799930 (Exp(b)= 2,968, ДИ 95% 1,033—8,527).

Для данной модели коэффициент детерминации $R^2=0,144$, что показывает статистически значимое объяснение данным генетическим фактором вероятности гепатотоксического действия противотуберкулёзных препаратов у исследуемой группы пациентов на 14,4%. При этом модель обладает высокой специфичностью в плане предсказания отсутствия появления гепатотоксичности (97,2%). Чувствительность модели (правильное предсказание случаев развития гепатотоксичности) — 17,4%. Общее число корректных предсказаний составило 77,9%

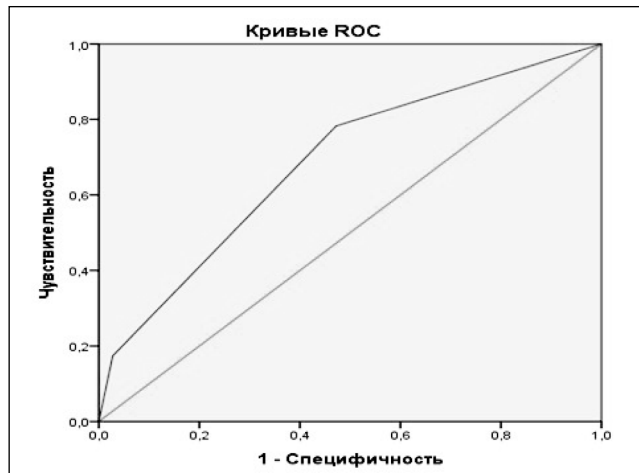


Рис. 1. ROC-кривая регрессионной модели развития гепатотоксического действия противотуберкулёзных препаратов в зависимости от присутствия генотипа AA гена rs1799931 и генотипов AA или AG гена rs1799930.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,685 \pm 0,064$ (ДИ 95% — 0,560—0,811), что является статистически значимым ($p=0,008$) и соответствует среднему качеству модели для предсказания гепатотоксичности (рис. 1).

Так же была построена модель, отражающая связь проявления гепатотоксичности противотуберкулёзных препаратов с генотипами TT и CT (аллеля Т) гена rs1041983. Данная модель представлена следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-3,420 + 1,392 x_1}}$$

где:

p — вероятность развития гепатотоксичности;

x_1 — наличие генотипов TT или CT (аллеля Т) гена rs1041983 (Exp(b)= 4,024, ДИ 95% 1,348—12,009).

Для данной модели коэффициент детерминации $R^2=0,109$, что даёт статистически значимое объяснение данным предиктором вероятности развития гепатотоксичности у исследуемой группы пациентов на 10,9%. При этом модель обладает 100% специфичностью в плане предсказания отсутствия появления гепатотоксичности, но не предсказывает факт её возникновения. Всего корректными были 75,8% прогнозов.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC являлся статистически значимым ($p=0,026$) и составил $0,655 \pm 0,063$ (ДИ 95% — 0,532—0,779), что указывает на среднее качество прогностической модели (рис. 2).

Таким образом, наличие генотипа AA гена rs1799931 и генотипов AA и AG (аллеля А) гена rs1799930, а так же присутствие генотипов TT или CT (аллеля Т) гена rs1041983, определяющих ак-

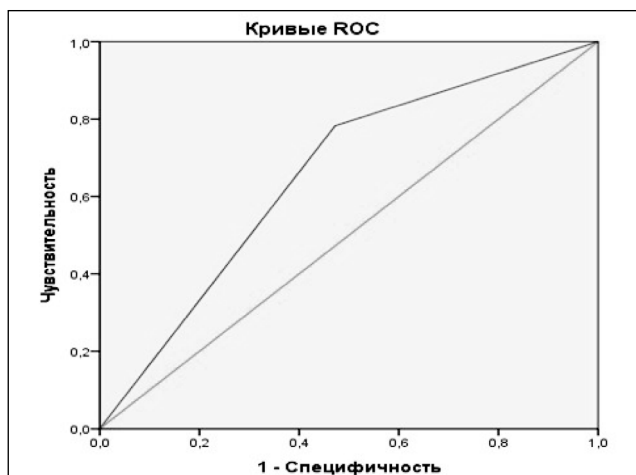


Рис. 2. ROC-кривая регрессионной модели развития гепатотоксического действия противотуберкулёзных препаратов в зависимости от присутствия генотипов ТТ или СТ гена rs1041983.

тивность фермента NAT2 статистически значимо увеличивают риск гепатотоксичности при приёме противотуберкулёзных препаратов у больных туберкулёзом лёгких.

Выводы

1. Лечение впервые выявленных больных с применением ПТП первого ряда (изониазид,

ЛИТЕРАТУРА

1. Туберкулёз в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг.: аналитический обзор основных статистических показателей по туберкулёзу, используемых в Российской Федерации и в мире. М.: 2015. — 312 с. / Tuberkuloz v Rossijskoj Federatsii, 2012/2013/2014 gg.: analiticheskij obzor osnovnykh statisticheskikh pokazatelej po tuberkulozu, ispol'zue-mykh v Rossijskoj Federatsii i v mire. M.: 2015; 312. [in Russian]
2. Иванова Д.А., Борисов С.Е. Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении больных туберкулёзом. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2017. — Т. 95. — №6. — С. 22—29. / Ivanova D.A., Borisov S.E. Spekr i faktory riska nezheatel'nykh pobochnykh reaktsij pri lechenii bol'nykh tuberkulozom. Tuberkuloz i bolezni lyogkikh 2017; 95: 6: 22—29. [in Russian]
3. Garibaldi R.A., Drusin R.E., Ferebee S.H., Gregg M.B. Isoniazid-associated hepatitis. Report of an outbreak. Am Rev Respir Dis 1972; 106: 357—365.
4. Saukkonen J.J., Cohn D.L., Jasmer R.M., Schenker S., Jereb J.A., Nolan C.M., Peloquin C.A., Gordin F.M., Nunes D., Strader D.B., Bernardo J., Venkataraman R., Sterling T.R. An Official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. Am J Resp Crit Care Med 2006; 174: 935—952.
5. Lee W.M. Drug-induced hepatotoxicity. New Eng J Med 2003; 349: 474—485.
6. Соколова Г.Б. Индивидуализированная химиотерапия туберкулёза лёгких (экспериментально-клиническое исследование). Дисс. д.м.н. в виде научного доклада, М.: 2000. / Sokolova G.B. Individualizirovannaya khimioterapiya tuberkuloza legkikh (ekhsperimental'no-klinicheskoe issledovanie). Diss. d.m.n. v vide nauchnogo doklada, M.: 2000.
7. Nelson S.D., Mitchell J.R., Timbrell J.A., Snodgrass W.R., Corcoran G.B. Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. Science 1976; 193 (4256): 901—903.
8. Mitchell J.R., Snodgrass W.R., Gillette J.R. The Role of Biotransformation in Chemical-Induced Liver Injury. Environmental Health Perspectives 1976; 15: 27—38.
9. Woodward K.N., Timbrell J.A. Acetylhydrazine hepatotoxicity: the role of covalent binding. Toxicology 1984; 30: 65—74.
10. Parkin D.P., Vandenplas S., Botha F.J., Vandenplas M.L., Seifart H.I., van Helden P.D., van der Walt B.J., Donald P.R., van Jaarsveld P.P.

рифампицин, пиразинамид) сопровождалось возникновением гепатотоксических реакций в 29,5% случаев.

2. У большинства пациентов гепатотоксические реакции проявлялись в виде изменений лабораторных показателей без клинических проявлений и носили преимущественно устраняемый характер.

3. У 34,8% пациентов гепатотоксические реакции потребовали отмены рифампицина и (или) изониазида, изменения схемы лечения и назначения дезинтоксикационной и гепатопротективной терапии.

4. Фактором риска развития гепатотоксических реакций при приёме комплекса противотуберкулёзных препаратов первого ряда у больных туберкулёзом является наличие генотипа АА гена rs1799931 и генотипов АА и АГ (аллеля А) гена rs1799930, а также присутствие генотипов ТТ или СТ (аллеля Т) гена rs1041983, определяющие активность фермента NAT2.

5. Ассоциации мутаций генов NAT2: rs1801279, rs1799929, rs1801280, rs1208, rs1045642 и гена GSTM1 (rs74837985) с возникновением гепатотоксических реакций при приёме комплекса противотуберкулёзных препаратов первого ряда у больных туберкулёзом не выявлено.

- Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1997; 155: 1717—1722.
11. Fretland A.J., Leff M.A., Doll M.A., Hein D.W. Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. Pharmacogenetics 2001; 11: 207—215.
 12. Zang Y., Doll M.A., Zhao S., States J.C., Hein D.W. Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. Carcinogenesis 2007; 28: 1665—1671.
 13. Chen B., Zhang W.X., Cai W.M. The influence of various genotypes on the metabolic activity of NAT2 in Chinese population. European Journal of Clinical Pharmacology 2006; 62: 355—359.
 14. Garcia-Martin E. Interethnic and intraethnic variability of NAT2 single nucleotide polymorphisms. Current Drug Metabolism 2008; 9 (6): 487—497.
 15. Макарова С.И. Роль полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к atopическим заболеваниям и гепатотоксичности к противотуберкулёзным препаратам. Автореф. дисс. д.м.н., Уфа; 2011. / Makarova S.I. Rol' polimorfizma genov fermentov biotransformatsii ksenobiotikov v predraspolozhenosti k atopicheskim zabolevaniyam i gepatotoksichnosti k protivotuberkulyoznym preparatam. Avtoref. diss. d.m.n., Ufa; 2011. [in Russian]
 16. Huang Y.S., Chern H.D., Su W.J., Wu J.C., Lai S.L., Yang S.Y., Chang F.Y., Lee S.D. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. Hepatology 2002; 35 883—889.
 17. Ohno M., Yamaguchi I., Yamamoto I., Fukuda T., Yolota S., Maekura R., Ito M., Yamamoto Y., Ogura T., Maeda K., Komuta K., Igarashi T., Azuma J. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. International Journal of Tuberculosis Lung Disease. 2000; 4: 256—261.
 18. Watanabe J., Hayashi S., Kawajiri K. Different regulations and expression of the human CYP2E1 gene due to the Rsa I polymorphism in the 5' flanking region. The Journal of Biochemistry 1994; 116: 321—326.
 19. Raquel Lima de Figueiredo Teixeira R.L.F., Lopes M.Q.P., Suffys P.N., Adalberto Rezende Santos A.R. Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art. Tuberculosis — Current Issues in Diagnosis and Management, Dr. Bassam Mahboub (Ed.), 2013; ISBN: 978-953-51-1049-1, InTech, DOI: 10.5772/54984.
 20. Teixeira R.L., Miranda A.B., Pacheco A.G., Lopes M.Q., Fonseca-Costa J., Rabahi M.F., Melo H.M., Kritski A.L., Mello F.C., Suffys P.N., Santos A.R.

- Genetic profile of the arylamine N-Acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutation Research* 2007; 624 31—40.
21. Roy B., Chowdhury A., Kundu S., Santra A., Dey B., Chakraborty M., Majumder P.P. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 «null» mutation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2001; 16: 1033—1037.
 22. Leiro V., Fernandez-Villar A., Valverde D., Constenla L., Vazquez R., Pineiro L., González-Quintela A. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Caucasian population. *Liver International* 2008; 28: 835-839.
 23. Teixeira R.L., Morato R.G., Cabello P.H., Muniz L.M., Moreira A. S., Kritski A.L., Mello F.C., Suffys P.N., Miranda A.B., Santos A.R. Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1, GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011; 106 (6): 716—724.
 24. Tang S.W., Lv X.Z., Zhang Y., Wu S.S., Yang Z.R., Xia Y.Y., Tu D.H., Deng P.Y., Ma Y., Chen D.F., Zhan S.Y. CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: a nested case-control study. *J Clin Pharm Ther* 2012. doi: 10.1111/j.1365-2710.2012.01334.x.
 25. Cai Y., Yi J., Zhou C., Shen X. Pharmacogenetic study of drug-metabolising enzyme polymorphisms on the risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *PLoS* 2012; ONE 7 (10): e47769. doi: 10.1371/journal.pone.0047769.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Казakov Алексей Владимирович — к. м. н., с. н. с. лаборатории туберкулёза у детей и подростков ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва

Можокина Галина Николаевна — д. м. н., в. н. с., лаборатория инфекционной иммунологии, патологии и биотехнологии клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва

Аксенова Валентина Александровна — профессор, д. м. н., зав. лабораторией туберкулёза у детей и подростков ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва

Смердин Сергей Викторович — профессор, д. м. н., главный врач Московского областного противотуберкулёзного диспансера, Москва

Попов Сергей Александрович — зав. микробиологической лабораторией ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва

Клевко Надежда Ивановна — д. м. н., в. н. с., лаборатории туберкулёза у детей и подростков ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва

Рагимов Алигейдар Алекперович — профессор, д. м. н. заведующий лабораторно гемотрансфузиологического комплекса, Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Кузнецов Олег Евгеньевич — к. м. н., доцент кафедры клинической трансфузиологии Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Козлов Василий Владимирович — к. м. н., доцент кафедры общественного здоровья и здравоохранения Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Эффективность реамберина в коррекции процессов липопероксидации при гастроинтестинальной форме сальмонеллёза

В. Ф. ПАВЕЛКИНА, Ю. Г. УСКОВА

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева, Саранск

The Efficacy of Reamberin in Correction of Lipoperoxidation Processes in the Gastrointestinal Form of Salmonellosis

V. F. PAVELKINA, YU. G. USKOVA

Ogarev Mordovia State University, Saransk

Целью исследования послужила оценка динамики процессов перекисного гомеостаза (перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты) при гастроинтестинальной форме сальмонеллёза средней степени тяжести на фоне комплексной терапии, включающей реамберин. Проведено обследование 70 больных сальмонеллёзом средней степени тяжести: 35 пациентов группы сравнения получали базисную терапию, 35 пациентов основной группы — дополнительно к базисной терапии препарат реамберин (внутривенно капельно, 1,5% — 500 мл в сутки, 5 дней). Эффективность терапии оценивали по динамике купирования клинической симптоматики и лабораторных данных: уровню диеновых конъюгатов (ДКо), диеновых кетонов (ДКе), малонового диальдегида плазмы и эритроцитов (МДАпл, МДАэр), каталазы плазмы и эритроцитов (Кпл, Кэр) и супероксиддисмутазы (СОД). Установлено, что в фазу клинического выздоровления при сальмонеллёзе сохраняется дисбаланс в прооксидантной и антиоксидантной системе. Включение реамберина в схему комплексной патогенетической терапии позволило более эффективно купировать клинические симптомы болезни и показатели перекисного гомеостаза, о чём свидетельствуют снижение продуктов липопероксидации (ДКо, ДКе, МДАпл, МДАэр) и повышение активности антиоксидантных ферментов (Кпл, Кэр, СОД). Включение реамберина в лечение больных сальмонеллёзом следует считать патогенетически обоснованным, клинически оправданным и перспективным.

Ключевые слова: сальмонеллёз, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, интоксикационный синдром, реамберин.

The purpose of the study was to evaluate the dynamics of the peroxidative homeostasis processes (lipid peroxidation and antioxidant protection) in the moderate gastrointestinal form of salmonellosis during complex therapy including reamberin. Seventy patients with moderate salmonellosis were examined: 35 patients of the control group received basic therapy, 35 patients of the main group received reamberin (intravenously, 1.5% — 500 ml per day, for 5 days) in addition to the basic therapy. The efficacy of therapy was assessed according to the dynamics of clinical symptoms relief and laboratory data: the level of diene conjugates (DCo), diene ketones (DKe), plasma and erythrocytes malonic dialdehyde (MDApl, MDAer), plasma and erythrocyte catalase (Cpl, Cer) and superoxide dismutase (SOD). It is established that an imbalance in the prooxidant and antioxidant system remains in the phase of clinical recovery from salmonellosis. The inclusion of reamberin in the complex pathogenetic therapy made it possible to more effectively cope with the clinical symptoms of the disease and the parameters of peroxide homeostasis, as evidenced by a decrease in lipid peroxidation products (DCo, DKe, MDApl, MDAer) and an increase in the activity of antioxidant enzymes (Cpl, Cer, SOD). The inclusion of reamberin in the treatment of patients with salmonellosis should be considered pathogenetically and clinically justified and promising.

Keywords: salmonellosis, lipid peroxidation, antioxidant protection, intoxication syndrome, reamberin.

Введение

Острые кишечные инфекции (ОКИ) в условиях глобализации антропогенных процессов

© В. Ф. Павелкина, Ю. Г. Ускова, 2018

Адрес для корреспонденции: 430005, г. Саранск, ул. Большевикская д. 68. Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева

имеют повсеместное распространение, занимают весомую долю в инфекционной патологии, нередко сопровождаются неблагоприятными исходами. К наиболее часто встречающимся острым кишечным инфекциям бактериальной этиологии в настоящее время относятся сальмонеллёзы, заболеваемость которыми остаётся одной из акту-

альных проблем для здравоохранения. В начале XXI века сальмонеллёзы в большинстве стран мира остаются столь же распространёнными кишечными инфекциями, как и в конце XX века [3].

В Республике Мордовия (РМ) заболеваемость сальмонеллёзом регистрируется ежегодно в течение многих лет и наблюдается её неуклонный рост: в 2016 г. она возросла в 1,55 раза по сравнению с 2015 г. В течение ряда последних лет заболеваемость сальмонеллёзом превышает среднефедеральный уровень: в 2013 г. — в 1,3 раза, в 2014 г. — в 1,2 раза, в 2015 г. — в 1,44 раза; в 2016 г. — в 2,2 раза [1, 11].

Заболевание представляет большую медицинскую и социальную проблему, приводя к формированию хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, бактерионосительства, вызывая продолжительные сроки временной нетрудоспособности пациентов [10, 14, 15].

Сальмонеллёзы — группа острых кишечных инфекций, вызываемых многочисленными бактериями рода *Salmonella*. Факторами патогенности данных возбудителей являются холероподобный энтеротоксин и липолисахаридный комплекс (эндотоксин). Для развития заболевания необходимо наличие большого количества сальмонелл и их токсинов с последующим проникновением антигенов в общий кровоток. Важную роль в патогенезе заболевания, развитии интоксикационного синдрома играет липолисахаридный комплекс (эндотоксин), оказывающий разнообразное действие на организм и способствующий развитию различных нарушений гомеостаза [2, 24].

Сальмонеллёз характеризуется развитием интоксикационного и гастроинтестинального синдромов. Интоксикационный синдром формируется в результате патологии первичной реакции на внедрение сальмонелл с последующим развитием большого количества внешних потерь воды и электролитов с рвотой и диареей. По мере прогрессирования дегидратации и деминерализации ведущими становятся симптомы обезвоживания, патологические реакции со стороны сердечно-сосудистой и центральной нервной системы [14].

В патогенезе сальмонеллёза большую роль играет активность процессов липоперекисления, которые протекают предпочтительно в биологических мембранах и являются примером свободнорадикальных процессов в организме [7]. Процессы свободнорадикального окисления (СРО) имеют большое значение в патогенезе бактериальных кишечных инфекций. Липолисахаридный комплекс (эндотоксин) сальмонелл приводит в различных клетках к активации циклооксигеназного и липооксигеназного путей превращения ненасыщенных жирных кислот, в том числе арахидоновой кислоты, биосинтеза лейкотриенов, простагландинов, тромбксана A_2 . При этом

эндотоксин ускоряет процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), способствует накоплению промежуточных продуктов обмена, оказывающих прямое цитотоксическое и мембраноповреждающее действия, стимулируя высвобождение субстрата для синтеза простагландинов. Этот порочный круг способен длительно поддерживать патофизиологические эквиваленты (гипоксия, ацидоз, воспаление, нарушение микроциркуляции и др.) клинических проявлений (расстройство гемодинамики, лихорадка, синдром диареи) [13, 14].

В источниках литературы последних лет недостаточно данных о состоянии оксидантной и антиоксидантной систем в динамике инфекционного процесса при сальмонеллёзе и воздействии на функционирование этих систем препаратами с антиоксидантной активностью. В настоящее время наиболее актуальным является изучение объективных критериев степени активности процессов липоперекисации, которые могут определять тяжесть течения, осложнения и исходы заболевания. Изучение комплексной оценки процессов ПОЛ при сальмонеллёзе поможет выявить некоторые патогенетические аспекты, объективизировать оценку степени тяжести заболевания, определить стадию выздоровления и необходимость использования при данной патологии средств с антиоксидантной активностью, в частности, реамберина (ООО НТФФ «ПОЛИСАН», г. Санкт-Петербург).

В составе патогенетической инфузионной терапии реамберин применялся при дизентерии для улучшения реологических свойств крови, ускорения выведения токсинов из организма, регидратации и коррекции водно-электролитного баланса. В состав раствора для инфузий входят соль янтарной кислоты и макроэлементы (магния, калия, натрия хлориды). Реамберин обладает антиоксидантным и антигипоксическим, энергопротективными эффектами, утилизирует жирные кислоты и глюкозу в клетках, уменьшает продукцию свободных радикалов, нормализует кислотно-щелочной баланс и газовый состав крови [17].

Доказана эффективность реамберина в клинических исследованиях при различной инфекционной патологии, в том числе и при кишечных инфекциях у взрослых и детей [19]. Другими авторами показано патогенетическое обоснование и перспективность применения современного детоксицирующего препарата реамберин в комплексной терапии больных острыми кишечными инфекциями, вызванными условно-патогенными бактериями [21].

В связи с этим несомненно, является, актуальным использование препаратов, содержащих в своем составе янтарную кислоту, обладающих антигипоксическим/антиоксидантным, дезинтоксикационным действием. Они используются для ку-

пирования симптомов интоксикации, обезвоживания, водно-электролитного баланса, коррекции процессов липопероксидации, что позволяет избежать назначения нескольких препаратов

Цель исследования — дать сравнительную оценку процессам перекисного гомеостаза при гастроинтестинальной форме сальмонеллёза средней степени тяжести при проведении базисной терапии и при дополнительном применении средства с антиоксидантными свойствами — реамберина.

Материал и методы

Работа выполнена в ГБУЗ РМ «Республиканская инфекционная клиническая больница» г. Саранск, сотрудниками кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева». Под наблюдением находилось 70 пациентов с гастроинтестинальной формой сальмонеллёза, средней степени тяжести (35 больных в основной группе, 35 — в группе сравнения). Диагноз сальмонеллёза у всех больных был подтвержден бактериологическим методом. Преобладающим возбудителем была *Salmonella enteritidis*. По полу и возрасту основная и группа сравнения были сопоставимы. Возраст пациентов варьировал от 18 до 62 лет (в основной группе средний возраст составил $44,79 \pm 1,68$, в группе сравнения — $43,80 \pm 1,65$ лет). В проводимом исследовании преобладали мужчины — 22 (62,86%) больных в основной группе и 20 (57,14%) пациентов в группе сравнения.

Критериями включения в исследование служили: 1—3-й дни заболевания на момент включения в исследование, гастроинтестинальная форма сальмонеллёза средней степени тяжести, подтверждённого бактериологическим методом, письменное информированное согласие пациента на включение в исследование. Критериями не включения были: длительность заболевания больше 3 суток, тяжёлая форма сальмонеллёза, бактерионосители сальмонелл, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, беременность, период лактации, ВИЧ-инфекция, тяжёлая соматическая патология (онкологические процессы, сахарный диабет, печёночная и почечная недостаточность) и хронические воспалительные заболевания в фазе обострения. В течение всего периода наблюдения бывших больных из исследования не зарегистрировано.

Основная группа пациентов (35 человек) дополнительно к базисной терапии получала препарат реамберин, обладающий многокомпонентным действием (антигипоксическим, антиоксидантным, дезинтоксикационным) [11, 17]. В состав препарата входят: меглюмина натрия сукцинат — 15 г (полученный по следующей прописи: меглюмин (N-метилглюкамин) — 8,725 г, янтарная кислота — 5,28 г), натрия хлорид — 6 г, калия хлорид — 0,3 г, магния хлорид — 0,12 г, натрия гидроксид — 1,788 г, вода для инъекций — до 1 л. Раствор реамберина (1,5%) назначали внутривенно капельно со скоростью 60 — 80 кап/мин в суточной дозе 500 мл в течение 5 дней, ежедневно. Пациенты группы сравнения (35 больных) получали базисную терапию (этиотропные, патогенетические и симптоматические лекарственные средства). В группу контроля были включены 32 практически здоровых добровольца в возрасте от 18 до 62 лет.

Эффективность проводимой терапии оценивали по клинической симптоматике сальмонеллёза и лабораторным показателям процессов липопероксидации и антиоксидантной защиты.

Активность процессов ПОЛ оценивали по уровню в плазме крови и эритроцитах первичных и вторичных продуктов липопериокисления, которые обладают выраженной цитотоксичностью. Диеновые кетоны (ДКе) и диеновые конъюгаты (ДКо) определяли спектрофотометрическим способом, малоновый диальдегид плазмы (МДАпл) и малоновый диаль-

дегид эритроцитов (МДАэр) исследовали в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой. Антиоксидантную защиту изучали по активности каталазы плазмы (Кпл), каталазы эритроцитов (Кэр), которые определяли спектрофотометрически и активности супероксиддисмутазы (СОД), исследуемой по ингибированию её молекулами фотохимического восстановления нитросинего тетразолия [5].

Пациенты обследовались в разгар заболевания (1—3-й дни болезни) и в фазу ранней реконвалесценции (7—10-й дни болезни). Полученные результаты обрабатывались статистически с помощью персонального компьютера и пакетов программ для статистической обработки «Microsoft Excel for Windows 4,0» и «Statistika 6,0». Вычисляли среднюю арифметическую (M), ошибку средней арифметической (m), критерий Стьюдента (t). Статистически значимыми считали различия при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В Республике Мордовия заболеваемость сальмонеллёзом держится стабильно на высоком уровне и значительно превышает аналогичный показатель в РФ в целом. Так, показатель заболеваемости в 2013 году в РФ составил 33,65, а в РМ — 53,7 на 100 тыс населения, в 2014 г. — 29,08 и 32,9; в 2015 г. — 25,39 и 36,5; в 2016 г. — 26,08 и 56,5 на 100 тыс населения, соответственно. Резкий рост заболеваемости наблюдался в 2013 и в 2016 гг.

Высокие уровни заболеваемости отмечены в г.о. Саранск (88,07 на 100 тыс населения), Лямбирском (84,46), Ромодановском (65,38), Ковылкинском (59,71), Кадошкинском (56,47), Темниковском (54,48) районах. Несколько ниже заболеваемость сальмонеллёзом зарегистрирована в Кочкуровском (49,57), Чамзинском (49,04), Рузавском (43,29) и др. районах РМ.

При изучении этиологии и эпидемиологии сальмонеллёза установлено, что регистрировался он в течение всего года, с преобладанием случаев заболевания с июня по октябрь. С незначительной разницей инфекция встречалась у лиц обоего пола (42 мужчины, 28 женщин), во всех возрастных группах. У 59 (84,3%) больных сальмонеллёз этиологически был обусловлен *S. enteritidis*. Достаточно высока частота случаев заболевания (7 пациентов), вызванных *S. muenchen* (10,0%). В остальных 4 (5,7%) случаях при бактериологическом исследовании испражнений с одинаковой частотой выделялись сальмонеллы: *typhimurium*, *newport*, *virchow*, *bowis moribificans*. Независимо от вида сальмонеллы, определена эпидемиологическая связь с употреблением больными в пищу куриных яиц, блюд из куриного мяса и реже — других пищевых продуктов (рыбы, колбасы и др.).

В клинической картине сальмонеллёза прослеживалось последовательное развитие следующих синдромов: интоксикационного, гастроинтестинального и водно-электролитных нарушений. Как известно, этиотропная терапия при гастроинтестинальной форме сальмонеллёза ограничена, поэтому совершенствование патогенетической терапии, направленной на коррекцию на-

Таблица 1. Длительность (в сутках) основных клинических симптомов при сальмонеллёзе на фоне различных методов терапии ($M \pm m$)

Симптомы	Группа сравнения, $n=35$	Основная группа, $n=35$	p
Температура	$3,61 \pm 0,72$	$2,87 \pm 0,54$	$> 0,05$
Головная боль	$2,44 \pm 0,68$	$2,23 \pm 0,54$	$> 0,05$
Общая слабость	$6,21 \pm 0,62$	$4,12 \pm 0,52$	$< 0,05$
Снижение аппетита	$3,21 \pm 0,40$	$1,92 \pm 0,32$	$< 0,05$
Тошнота, рвота	$2,73 \pm 0,30$	$1,95 \pm 0,21$	$< 0,05$
Диарея	$5,62 \pm 0,58$	$4,12 \pm 0,44$	$< 0,05$
Сухость во рту, жажда	$3,28 \pm 0,54$	$3,15 \pm 0,66$	$> 0,05$
Абдоминальная боль	$4,00 \pm 0,52$	$3,62 \pm 0,54$	$> 0,05$
Тахикардия	$3,52 \pm 0,51$	$2,20 \pm 0,32$	$< 0,05$
Гипотония	$3,12 \pm 0,31$	$2,10 \pm 0,30$	$< 0,05$

Примечание. p – достоверность различий между показателями основной группы и группы сравнения.

рушенных процессов в организме, является актуальной проблемой.

В последние годы показаны преимущества применения в комплексном лечении инфекционных заболеваний препаратов, обладающих многокомпонентным действием. Таким препаратом является реамберин, обладающий антиоксидантным, антигипоксикантным и энергопротективным эффектами [11, 15, 17, 19]. Что полностью соответствует направлениям коррекции патогенетических составляющих гастроинтестинальной формы сальмонеллёза.

Основные клинические симптомы и их динамика в исследуемых группах представлены в табл. 1. Анализ данных клинических признаков в группе пациентов, получающих реамберин, показал сокращение продолжительности ведущих симптомов сальмонеллёза. Длительность тошноты и рвоты снижалась с $2,73 \pm 0,30$ до $1,95 \pm 0,21$ сут, сниженного аппетита — с $3,21 \pm 0,40$ до $1,92 \pm 0,32$ сут, синдрома диареи — с $5,62 \pm 0,58$ до $4,12 \pm 0,44$ сут, общей слабости — с $6,21 \pm 0,62$ до $4,12 \pm 0,52$ сут, тахикардии — с $3,52 \pm 0,51$ до $2,20 \pm 0,32$ сут ($p < 0,05$), гипотонии — с $3,12 \pm 0,31$ до $2,10 \pm 0,30$ сут. Продолжительность тошноты и рвоты снижалась в группе сравнения в 54,3% (у 19 больных из 35), в основной группе — в 80,0% (у 28 больных из 35). Уменьшение продолжительности плохого аппетита в группе сравнения наблюдалось в 57,14% (у 20 больных из 35), в основной группе — в 88,6% (у 31 больного из 35). Длительность синдрома диареи при проведении базисной терапии снижалась в 51,43% (у 18 больных из 35), при дополнительном применении реамберина в 85,71% (у 30 больных из 35). Длительность общей слабости снижалась в группе сравнения в 51,43% (у 18 больных из 35), в основной группе — в 82,86% (у 29 больных из 35). Продолжительность тахикардии укорачивалась в группе сравнения в 42,86% (у 15 больных из 35), в основной группе — в 65,71% (у 23 больных из 35). Длительность периода гипотонии сокращалась на фоне базисной терапии в 48,57% (у 17 больных из 35), в группе, получающей реамберин — в 71,43% (у 25 больных из 35). При этом, сочетанная терапия с реамберин

не оказала влияния на длительность лихорадки, жажды, сухости во рту, абдоминальной и головной боли ($p > 0,05$).

В других работах также отмечено позитивное влияние на клиническое течение острых кишечных инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями, характеризующееся достоверным уменьшением длительности сохранения инфекционно-токсического и диарейного синдрома, а также боли в животе [21]. Применение реамберина у детей при тяжёлой форме ОКИ уменьшает клинические и лабораторные показатели токсикоза и улучшает реологические свойства крови [8, 9].

Авторы других исследований показали, что использование реамберина в комплексе инфузионной терапии у детей с тяжёлыми формами ОКИ приводит к более раннему исчезновению интоксикации, нормализации лабораторных показателей эндогенной интоксикации (ЭИ) [4, 8]. Введение в состав инфузионной терапии у взрослых больных ОКИ реамберина приводит к более быстрому купированию основных проявлений интоксикации, гастроэнтерита, нормализации лейкоцитарного индекса интоксикации [18].

Данные других авторов свидетельствуют о высокой эффективности реамберина в терапии ОКИ детей с целью купирования интоксикации, обезвоживания, метаболического ацидоза. Исследователи выявили также нефропротективные и кардиопротективные свойства реамберина [15].

Исследования разных лет показали, что применение реамберина при ОКИ у детей способствует улучшению самочувствия больных, быстрому купированию синдрома интоксикации, сокращению периода лихорадки [6, 8, 17–19].

Ведущую роль в возникновении и развитии интоксикационного синдрома при сальмонеллёзе играют мембрано-деструктивные процессы ПОЛ. В настоящее время возрос интерес к исследованиям ПОЛ, о чём свидетельствуют работы последних лет, отражающих их важную роль в патогенезе кишечных инфекций [12, 17, 20].

Таблица 2. Динамика показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при сальмонеллёзе на фоне базисной терапии ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые, $n=32$	Период разгара, $n=35$	Период реконвалесценции, $n=35$	p_1	p_2
ДКо, ед/мл	$0,210 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,02$	$<0,001$	$<0,001$
ДКе, ед/мл	$0,070 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$<0,001$	$<0,001$
МДАпл, мкмоль/л	$2,18 \pm 0,02$	$7,42 \pm 0,51$	$7,84 \pm 0,53$	$<0,001$	$<0,001$
МДАэр, мкмоль/л	$16,36 \pm 1,34$	$35,23 \pm 2,21$	$34,25 \pm 1,92$	$<0,001$	$<0,001$
Кпл, мккат/л	$5,1 \pm 0,10$	$2,84 \pm 0,14$	$2,98 \pm 0,13$	$<0,001$	$<0,001$
Кэр, мккат/л	$4,23 \pm 0,16$	$2,44 \pm 0,18$	$2,62 \pm 0,14$	$<0,001$	$<0,001$
СОД, ед. акт.	$0,61 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,04$	$>0,05$	$<0,001$

Примечание. p_1 — достоверность различий между показателями периода разгара и здоровыми; p_2 — периода ранней реконвалесценции и здоровыми.

Поэтому при выборе препарата для коррекции интоксикационного синдрома при ОКИ учитывали тот факт, что важную роль в патогенезе сальмонеллёза имеет дисбаланс между оксидантной и антиоксидантной системами. Известно, что лекарственные средства, содержащие янтарную кислоту, в частности реамберин, обладают антиоксидантным эффектом.

Процессы ПОЛ у здоровых лиц заканчиваются на стадии первичных продуктов. При развитии заболеваний неконтролируемое высвобождение активных форм кислорода (АФК) в случаях несостоятельности компенсаторных систем на фоне ЭИ приводит к оксидативному стрессу. По мере углубления тяжести ЭИ происходит интенсификация ПОЛ. Под влиянием АФК первичные продукты претерпевают последующие превращения, образуются вторичные и конечные продукты липопероксидации, представляющие собой более токсичные соединения [16, 23].

Изучая активность первичных продуктов ПОЛ при гастроинтестинальной форме сальмонеллёза в фазу основных клинических проявлений (период разгара), содержание диеновых конъюгатов было значительно повышено ($0,38 \pm 0,03$ ед/мл), в ранней реконвалесцентный период их уровень также оставался высоким ($0,36 \pm 0,02$ ед/мл). Диеновые конъюгаты — первичные продукты липопероксидации, которые являются токсическими метаболитами и могут вызывать повреждение нуклеиновых кислот, липопротеидов, белков и ферментов. Отмечены также высокие значения показателя вторичных продукта ПОЛ — диеновых кетонов в течение всего периода наблюдения. В период разгара они составляли $0,14 \pm 0,01$ ед/мл, и в фазу клинического выздоровления — $0,17 \pm 0,02$ ед/мл, что констатирует высокую степень активности оксидативных процессов в фазу ранней реконвалесценции (табл. 2). После проведённой базисной терапии уровень ДКо снижался в 54,3% (у 19 больных из 35) и ДКе в 48,6% (у 17 больных из 35).

В разгар болезни уровень одного из конечных продуктов перекисного гомеостаза — МДАпл был повышен, составляя $7,42 \pm 0,51$ мкмоль/л, в фазу

ранней реконвалесценции он оставался высоким — $7,84 \pm 0,53$ мкмоль/л. Концентрация МДАпл снижалась в 37,14% (у 13 больных из 35), что свидетельствует о выраженной интенсивности процессов липопероксидации и о незавершённости патологического процесса.

Другими авторами выявлено повышение МДА при пищевых токсикоинфекциях (ПТИ) и сальмонеллёзе. При среднетяжёлом и тяжёлом течении заболевания в периоде ранней реконвалесценции содержание МДА было выше нормальных показателей [7].

Содержание малонового диальдегида эритроцитов весь период наблюдения также было повышенным — $35,23 \pm 2,21$ и $34,25 \pm 1,92$ мкмоль/л, соответственно периоду болезни ($p < 0,001$), свидетельствуя о гиперактивации свободно-радикальных процессов (табл. 2). Базисная терапия способствовала снижению МДАэр у 15 больных из 35, что составило 42,86%.

Выраженная активация процессов ПОЛ при острых кишечных инфекциях у взрослых лиц, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, отражена в другом исследовании [21].

Изучение процессов свободнорадикального окисления в динамике ОКИ отражено в ряде работ. Данные наших исследований согласуются с исследователями, выявившими, что при ПТИ, дизентерии, сальмонеллёзе развивается дисбаланс перекисного гомеостаза. Происходит накопление начальных и промежуточных продуктов липопероксидации в крови, снижение общей АОЗ плазмы крови [7, 20, 17, 21].

Согласно литературным данным, накопление первичных и вторичных продуктов липопероксидации вызывает деструкцию и дестабилизацию фосфолипидов мембран клеток и субклеточных органелл. В результате чего развиваются эндогенная интоксикация, нарушения в иммунном статусе (изменяется фагоцитоз, пиноцитоз, клеточная миграция и др.), необратимая инактивация ферментов и в конечном итоге — гибель клеток [5].

Таким образом, процессы липопероксидации сохраняли свою высокую активность в фазу клинического выздоровления пациентов, что обос-

Таблица 3. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при сальмонеллёзе на фоне различных методов терапии ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые, $n=32$	Период разгара, $n=35$	Период реконвалесценции, $n=35$	p_1	p_2
ДКо, ед/мл	$0,210 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	$<0,05$	$<0,01$
ДКе, ед/мл	$0,070 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,010$	$<0,05$	$<0,001$
МДАпл мкмоль/л	$2,18 \pm 0,02$	$7,84 \pm 0,53$	$3,96 \pm 0,45$	$<0,001$	$<0,001$
МДАэр, мкмоль/л	$16,36 \pm 1,34$	$34,25 \pm 1,92$	$26,52 \pm 1,84$	$<0,01$	$<0,001$
Кпл, мккат/л	$5,10 \pm 0,10$	$2,98 \pm 0,13$	$3,96 \pm 0,14$	$<0,001$	$<0,001$
Кэр, мккат/л	$4,23 \pm 0,16$	$2,62 \pm 0,14$	$3,56 \pm 0,13$	$<0,001$	$<0,01$
СОД, ед. акт.	$0,61 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,03$	$<0,05$	$<0,05$

Примечание. p_1 — достоверность различий между показателями основной группы и группы сравнения; p_2 — между показателями основной группы и здоровыми.

новывает проведение патогенетической коррекции перекисного гомеостаза.

Использование реамберина в патогенетической терапии сальмонеллёза способствовало стабилизации оксидативных процессов. Включение препарата в комплексную терапию способствовало снижению ДКо в 85,71% (у 30 больных из 35), что составило $0,28 \pm 0,02$ ед/мл, ($p < 0,05$) и ДКе в 74,29% (у 26 больных из 35) и соответствовало значению $0,12 \pm 0,01$ ед/мл ($p < 0,001$) (табл. 3).

Инфузионный препарат с антиоксидантным эффектом способствовал снижению содержания вторичного продукта липопериокисления — МДАпл до $3,96 \pm 0,45$ мкмоль/л ($p < 0,001$), МДАэр до $26,52 \pm 1,84$ мкмоль/л ($p < 0,01$) (см. табл. 3). После проведения антиоксидантной терапии концентрация МДАпл снижалась в 65,71% (у 23 больных из 35), МДАэр — в 60% (у 21 пациента из 35). При этом вышеуказанные лабораторные показатели оставались выше значений условно здоровых добровольцев, что, вероятно, обосновывает усовершенствование схемы применения препарата.

В исследованиях других авторов отмечена нормализация МДА в сыворотке крови при использовании реамберина в лечении взрослых больных острыми кишечными инфекциями, вызванными условно-патогенными бактериями [21].

Сальмонеллёзная интоксикация сопровождалась выраженной активностью оксидативных процессов, протекающих в условиях дисбаланса в системе АОЗ. Активность антиоксидантных ферментов весь период наблюдения была низкой.

На протяжении всего периода наблюдения зафиксирована низкая активность каталазы плазмы, которая составила $2,84 \pm 0,14$ мккат/л в разгар заболевания и $2,98 \pm 0,13$ мккат/л — в период ранней реконвалесценции ($p < 0,001$) (см. табл. 2). Динамика показателей Кэр была аналогичной, составляя $2,44 \pm 0,18$ и $2,62 \pm 0,14$ мккат/л, соответственно, периода заболевания, что ниже показателей условно здоровых лиц в 1,73 и 1,62 раза. Базисная терапия способствовала повышению Кпл лишь у 40% больных (у 14 из 35) и Кэр у 42,86% больных (у 15 из 35).

Другие авторы обнаружили существенное снижение содержания антиоксиданта церуло-

плазмина в плазме крови у больных сальмонеллёзом и пищевыми токсикоинфекциями [7].

Аналогичные статистические данные опубликованы другими исследователями, изучавшими процессы ПОЛ и АОЗ при острых кишечных инфекциях: снижение церулоплазмина [7], каталазы плазмы [20], СОД [22].

Анализируя активность другого фермента антиоксидантной системы — супероксиддисмутазы, установлено, что в первые 2—3 дня она была сопоставима с показателем условно здоровых добровольцев, составляя $0,71 \pm 0,05$ ед. акт. При этом в фазу клинического выздоровления активность фермента СОД снижалась до $0,42 \pm 0,04$ ед. акт. и была ниже значений контрольной группы в 1,5 раза ($p < 0,001$). После проведения базисной терапии активность СОД повышалась лишь у 14,29% больных (у 5 из 35).

Реамберин, применённый дополнительно к базисной терапии, оказывал корригирующее влияние на систему ПОЛ — АОЗ организма больных сальмонеллёзом. Активность Кпл повышалась в 62,86% (у 22 пациентов из 35), что составило $3,96 \pm 0,14$ мккат/л ($p < 0,001$), Кэр — в 68,57% (у 24 больных из 35), составляя $3,56 \pm 0,13$ мккат/л ($p < 0,01$). Однако оба фермента не достигали уровня показателей в контроле. При этом препарат способствовал активации другого антиоксидантного фермента — СОД до $0,52 \pm 0,03$ ед. акт., оставаясь, однако, ниже показателя здоровых лиц (табл. 3). Включенный в комплексную терапию сальмонеллёза реамберин приводил к активации СОД в 57,14% (в 20 случаях из 35). Все это свидетельствует об эффективности исследуемого препарата, коррекции дисбаланса между оксидантной и антиоксидантной системами, что может способствовать уменьшению повреждающего влияния активных форм кислорода и нормализации обменных процессов к периоду клинического выздоровления ОКИ.

Авторы другого исследования показали, что реамберин способствует снижению интенсивности оксидативных процессов уже в ранние сроки заболевания у детей при ОКИ с высокой активацией СРО [17].

Таким образом, в фазу клинического выздоровления при гастроинтестинальной форме сальмонеллёза сохраняется дисбаланс в прооксидантной и антиоксидантной системе: активация процессов липопероксидации и супрессия АОЗ. Это может приводить к вялотекущему течению инфекционного процесса, формированию хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, длительного носительства, что требует фармакологической коррекции свободнорадикальных процессов. Применение реамберина приводит к коррекции процессов липопериокисления и восстановлению собственного антиоксидантного потенциала организма.

Выводы

1. При гастроинтестинальной форме сальмонеллёза развивается дисбаланс в прооксидантной и антиоксидантной системе: активация процессов перекисного окисления липидов (повышение диеновых конъюгатов, диеновых кетонов, малонового диальдегида плазмы и эритроцитов) и депрессия антиоксидантной защиты (снижение активности каталазы плазмы и эритроцитов, супероксиддисмутазы).

ЛИТЕРАТУРА

1. Амплеева Н.П., Черемисова А.Н., Абсатарова К.Э. Эпидемиологическая характеристика сальмонеллеза. *Инфекционные болезни*. — 2017. — Т. 15. — № 1. — С. 19–20. / Ampleeva N.P., SCheremisova A.N., Absatarova K.Eh. EHpidemiologicheskaya kharakteristika sal'monelleza. *Infekcionnye bolezni* 2017; 15; 1: 19–20. [in Russian]
2. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. Структура и биологические эффекты эндотоксинов грамотрицательных бактерий. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. — 2008. — № 5. — С. 61–64. / Afanas'eva G.A., SChesnokova N.P. Struktura i biologicheskie ehffekty ehndotoksinov gramotricatel'nykh bakterij. *Ehpidemiologiya i infekcionnye bolezni* 2008; 5: 61–64. [in Russian]
3. Брик Н.Н., Покровский В.И. Глобализация и эпидемический процесс. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2010. — № 4. — С. 4–10. / Briko N.N., Pokrovskij V.I. Globalizaciya i ehpidemicheskij process. *Ehpidemiologiya i infekcionnye bolezni* 2010; 4: 4–10. [in Russian]
4. Головакова Н.Ф., Жила В.Г., Молочный В.П. и др. Клиническая эффективность препарата реамберин в комплексной терапии тяжёлых форм кишечных инфекций у детей: материалы III региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии на Дальнем Востоке» «Дальневосточный журнал инфекционной патологии». — 2008. — №12. — С. 164. / Golovkova N.F., Zhila V.G., Molochnyj V.P. i dr. Klinicheskaya ehffektivnost' preparata reamberin v kompleksnoj terapii tyazhyolykh form kishhechnykh infekcij u detej: materialy III regional'noj nauchno-prakticheskoj konferencii «Aktual'nyj voprosy infekcionnoj patologii na Dal'nem Vostoke» «Dal'nevostochnyj zhurnal infekcionnoj patologii». 2008; 12: 164. [in Russian]
5. Егоров Д.Ю., Козлов А.В. Природа продуктов ПОЛ, определяемая в сыворотке крови по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой. *Деп. в ВИНТИ* 1988. — 30.08.88. — № 6766 — В-88. / Egorov D.YU., Kozlov A.V. Priroda produktov POL, opredelyaemaya v syvorotke krovi po reakcii s 2-tiobarbiturovoj kislotoj. *Dep. v VINITI* 1988. — 30.08.88. — № 6766 — V-88. [in Russian]
6. Заплутанов В.А., Романцов М.Г., Тихонова Е.О. др. Особенности течения острых кишечных инфекций с оценкой эффективности патогенетической терапии. *Антибиотики и химиотер.* — 2012. — № 9 — 10. — С. 17–24. / Zaplutanov V.A., Romancov M.G., Tikhonova E.O. dr. Osobennosti techeniya ostrykh kishhechnykh infekcij s ocenkoj ehffektivnosti patogene-ticheskoj terapii. *Antibiotiki i khimioter* 2012; 9 — 10: 17–24. [in Russian]
7. Камбачокова З.А. Состояние прооксидантной и антиоксидантной системы крови у больных пищевыми токсикоинфекциями и сальмонеллёзом. *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Нальчик, 2006. / Kambachokova Z.A. Sostoyanie prooksidantnoj i antioksidantnoj sistemy krovi u bol'nykh pishchevymi toksikoinfekciyami i sal'monellyozom. *Avtoref. dis. kand. med. nauk*, Nal'chik, 2006. [in Russian]
8. Михайлова Е.В., Каральский С.А., Кошкин А.П. и др. Эффективность препарата реамберин при лечении тяжёлых форм острой кишечной инфекции у детей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2011. — Т. 74. — № 11. — С. 33–35. / Mikhajlova E.V., Karal'skij S.A., Koshkin A.P. i dr. Ehffektivnost' preparata reamberin pri lechenii tyazhyolykh form ostroj kishhechnoj infekcii u detej. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* 2011; 74: 11: 33–35. [in Russian]
9. Михайлова Е.В., Чудакова Т.К. Инфузионная терапия острых кишечных инфекций у детей. *Вестник интенсивной терапии*. — 2006. — №4. — С. 65–67. / Mikhajlova E.V., SChudakova T.K. Infuzionnaya terapiya ostrykh kishhechnykh infekcij u detej. *Vestnik intensivnoj terapii* 2006; 4: 65–67. [in Russian]
10. Мокрецова Е.В. Клиника и патоморфологические аспекты патогенеза гастроинтестинальной формы сальмонеллёза. *Автореф. дис. канд. мед. наук*, М.: 2003. / Mokrecova E.V. Klinika i patomorfologicheskie aspekty patogeneza gastrointestinal'noj formy sal'monellyoza. *Avtoref. dis. kand. med. nauk*, M.: 2003. [in Russian]
11. Павелкина В.Ф., Альмяшева Р.З., Ускова Ю.Г. Применение реамберина для коррекции синдрома эндогенной интоксикации при сальмонеллёзе. *Клиническая медицина*. — 2012. — Т. 90. — № 12. — С. 60–64. / Pavelkina V.F., Al'myasheva R.Z., Uskova YU.G. Primenenie reamberina dlya korrekcii sindroma ehndogennoj intok-sikacii pri sal'monellyoze. *Klinicheskaya medicina* 2012; 90: 12: 60–64. [in Russian]
12. Павелкина В.Ф., Пак С.Г., Еровиченков А.А. Клинико-патогенетическое значение активации перекисного окисления липидов у больных сальмонеллёзом и пути его коррекции. *Инфекционные болезни*. — 2008. — Т. 6. — № 4. — С. 32–36. / Pavelkina V.F., Pak S.G., Erovichenkov A.A. Kliniko-patoge-neticheskoe znachenie aktivacii perekisnogo okisleniya lipidov u bol'nykh sal'monellyozom i puti ego korrekcii. *Infekcionnye bolezni* 2008; 6: 4: 32–36. [in Russian]
13. Пак С.Г. Инфекционные болезни: взгляд через призму времени (Актовая речь). *ММА им. И.М. Сеченова*, М.: 2005. / Pak S.G. Infekcionnye bolezni: vzglyad cherez prizmu vremeni (Aktovaya rech'). *MMA im. I.M. Sechenova*, M.: 2005. [in Russian]
14. Пак С.Г., Турьянов М.Х., Пальцев М.А. Сальмонеллёз. *Медицина*, М.: 1988. / Pak S.G., Tur'yanov M.KH., Pal'cev M.A. Sal'monellyoz. *Medicina*, M.: 1988. [in Russian]
15. Плоскирева А.А., Горелов А.В., Жучкова С.Н. и др. Современные подходы к интенсивной терапии острых кишечных инфекций у детей. *Инфекционные болезни*. — 2012. — Т. 10. — № 1. — С. 50–55. / Ploskireva A.A., Gorelov A.V., Zhuchkova S.N. i dr. Sovremennye podkhody k intensivnoj terapii ostrykh kishhechnykh infekcij u detej. *Infekcionnye bolezni* 2012; 10: 1: 50–55. [in Russian]
16. Савельев В.С., Петухов В.А. Липидный дистресс-синдром: методические рекомендации. *МАКС Пресс*, М.: 2005. / Savel'ev V.S.,

- Petukhov V.A. Lipidnyj distress-sindrom: metodicheskie rekomendacii. MAKS Press, M.: 2005. [in Russian]
17. Тихомирова О.В., Романцов М.Г., Михайлова Е.В., Говорова Л.В. Коррекция нарушений антиоксидантной системы у детей с острыми кишечными инфекциями. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2010. — Т. 73. — № 9. — С. 28—33. / Tikhomirova O.V., Romanov M.G., Mikhajlova E.V., Govorova L.V. Korrekciya narushenij antioksidantnoj sistemy u detej s ostrymi kishhechnymi infekciyami. *EHksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* 2010; 73: 9: 28—33. [in Russian]
 18. Тихонова Е.О., Ляпина Е.П., Шульдяков А.А. Изучение эффективности и патогенетической терапии больных острыми кишечными инфекциями с использованием сукцинат-содержащего препарата реамберина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2013. — Т. 76. — № 1. — С. 11—13. / Tikhonova E.O., Lyapina E.P., SHul'dyakov A.A. Izuchenie ehffektivnosti i patogeneticheskoy terapii bol'nykh ostrymi kishhechnymi infekciyami s ispol'zovaniem suksinat-soderzhashchego preparata reamberina. *EHksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* 2013; 76: 1: 11—13. [in Russian]
 19. Тихонова Е.О., Ляпина Е.П., Шульдяков А.А., Сатарова С.А. Использование препаратов, содержащих сукцинат, в клинике инфекционных болезней. *Терапевтический архив*. — 2016. — № 11. — С. 121—127. / Tikhonova E.O., Lyapina E.P., SHul'dyakov A.A., Satarova S.A. Ispol'zovanie preparatov, soderzhashchikh suksinat, v klinike infekcionnykh boleznej. *Terapevticheskij arkhiv* 2016; 11: 121—127. [in Russian]
 20. Ускова Ю.Г., Павелкина В.Ф., Альмяшева Р.З., Амлеева Н.П. Активность перекисного окисления липидов при гастроинтестинальной форме сальмонеллеза среднетяжелой и тяжелой формы. *Академический журнал Западной Сибири*. — 2014. — Т. 10. — № 2. — С. 108—109. / Uskova YU.G., Pavelkina V.F., Al'myasheva R.Z., Ampleeva N.P. Aktivnost' perekisnogo okisleniya lipidov pri gastrointestinal'noj forme sal'monelleza srednetyazhelej i tyazhelej formy. *Akademicheskij zhurnal Zapadnoj Sibiri* 2014; 10: 2: 108—109. [in Russian]
 21. Фролов В.М., Пересадин Н.А., Соцкая Я.А., Круглова О.В. Эффективность реамберина при лечении больных острыми кишечными инфекциями, вызванными условно-патогенными бактериями. *Клиническая медицина*. — 2013. — №1. — С. 62—65. / Frolov V.M., Peresadin N.A., Sockaya YA.A., Kruglova O.V. Effektivnost' reamberina pri lechenii bol'nykh ostrymi kishhechnymi infekciyami, vyzvannymi uslovno-patogennymi bakteriyami. *Klinicheskaya medicina* 2013; 1: 62—65. [in Russian]
 22. Хворостухина А.И., Еремин В.И., Заяц Н.А. Процессы свободнорадикального окисления при острых кишечных инфекциях у детей. *Инфекционные болезни*. — 2009. — Т. 7. — № 1. — С. 222. / Khvorostukhina A.I., Eremin V.I., Zayac N.A. Processy svobodno-radikal'nogo okisleniya pri ostrym kishhechnym infekciyakh u detej. *Infekcionnye bolezni* 2009; 7: 1: 222. [in Russian]
 23. Betteridge D.J. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000; 49 (1): 3—8.
 24. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York, 2010; 7 ed.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Вера Федоровна Павелкина — д. м. н., профессор, заведующая Кафедрой инфекционных болезней Медицинского института ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», Саранск

Ускова Юлия Геннадьевна — аспирант кафедры инфекционных болезней Медицинского института ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», Саранск

Антибактериальные антибиотики и бактериальные пробиотики: ВОЗМОЖНО ЛИ СОВМЕСТИТЬ НЕСОВМЕСТИМОЕ

В. И. КОЧЕРОВЕЦ

Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

Antibacterial Antibiotics and Bacterial Probiotics: is it Possible to Combine the Incompatible

V. I. KOCHEROVETS

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Цель исследования. Проанализировать информационную базу данных обоснованности и эффективности одномоментного применения бактериальных пробиотических препаратов с противобактериальными антибиотиками в процессе антимикробной терапии. **Материал и методы.** В обзор включены материалы зарубежных и отечественных исследователей, опубликованные в современной периодической и монографической литературе. **Результаты.** Представлен понятийный материал основных терминов и определений «идеальных» антибиотиков и пробиотиков. Установлена доминирующая роль пробиотических бактериальных препаратов в группе лекарственных пробиотиков для медицинского применения на российском фармацевтическом рынке. Проведена сравнительная оценка данных по паспортизации, идентификации и чувствительности к антибиотикам ряда коммерческих пробиотических культур. Отмечены особенности современной практики изучения и интерпретации результатов тестов на чувствительность к антибиотикам пробиотических бактериальных культур и клинически значимых микроорганизмов. Рассмотрены вопросы теории и практики совместного применения антибиотиков, пробиотиков и метабиотиков в процессе антимикробной терапии. **Заключение.** Современная информационная база данных практики совместного применения бактериальных пробиотических препаратов и антибиотиков в процессе антимикробной терапии крайне ограничена и свидетельствует о наличии серьёзных обстоятельств, потенциально снижающих эффективность пробиотикотерапии. Одним из направлений, позволяющих обойти эту ситуацию, является приём метабиотиков в форме лекарственных препаратов.

Ключевые слова: антибиотики, амоксициллин, пробиотики, метабиотики, лактобациллы.

The purpose of the study was to analyze validity and effectiveness of simultaneous application of bacterial probiotics and antibacterial antibiotics during antimicrobial therapy. **Materials and methods.** The review includes materials of foreign and domestic researchers published in modern periodical and monographic literature. **Results.** The conceptual material of the main terms and definitions of «ideal» antibiotics and probiotics is presented. The dominant role of bacterial probiotics in the group of medical probiotics in the Russian pharmaceutical market was established. A comparative assessment of the data on the passportization, identification, and sensitivity to antibiotics of a number of commercial probiotic cultures was carried out. The article considers theoretical and practical joint use of antibiotics, probiotics, and metabiotics during antimicrobial therapy. **Conclusion.** The current practice of joint use of probiotics and antibiotics in the process of antimicrobial therapy is extremely limited and indicates the presence of serious circumstances that reduce the effectiveness of probiotic therapy. One of the directions that exclude this situation is the use of metabiotics in the form of medications.

Keywords: antibiotics, amoxicillin, probiotics, metabiotics, lactobacilli.

В настоящее время для клиницистов и исследователей в сфере медицинского применения пробиотиков одной из актуальных тем является обоснованность и эффективность одномоментного приёма бактериальных пробиотических препаратов с противобактериальными антибиотиками в процессе целевой антимикробной терапии [1]. При всей бесспорности положительного эффекта антибиотикотерапии и отдельных штаммов

при пробиотикотерапии существуют определённые сомнения в оптимальности совместного приёма антибактериальных антибиотиков и бактериальных пробиотиков [2]. Это не удивительно даже по чисто формальным обстоятельствам на уровне лексики. В переводе с греческого языка термин пробиотик («pro-» — для; «bios» — жизнь) можно трактовать как активатор жизни. Напротив, антибиотики являются антонимом пробиотикам («anti-» — против; «bios» — жизнь) [3]. Не секрет, что многие фармакологические и фармацевтические характеристики препаратов данных лекарственных групп являются разнонаправленными по

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8 стр. 2. ПМГМУ им. И. М. Сеченова

механизму действия и адресной мишени [4]. Применительно к цели нашего обзора рассмотрим фармакотерапевтические характеристики указанных лекарственных средств.

Антибактериальные антибиотики

Современное представление учёных и клиницистов об идеальном антибиотике можно проанализировать в следующем контексте.

Определение. Антибиотики — это химические вещества способные в разведённом состоянии убивать или подавлять рост микроорганизмов [5].

Требования к идеальному антибиотику [6]:

1. Селективность.
2. Водорастворимость.
3. Минимум побочных проявлений.
4. Низкая стоимость.
5. Медленное развитие устойчивости.
6. Стабильность.

Указанные выше позиции, сформулированные в Bhattacharjee 2016 [6], необходимо кратко прокомментировать исходя из оригинального текста.

Селективность — это способность убивать инфекционные микроорганизмы при минимальном вреде для клеток хозяина. Селективность антибиотиков одна из самых существенных характеристик. Она может осуществляться двумя возможными путями:

а) когда мишень представлена только инфицируемыми бактериями, а организм хозяина при этом остаётся интактным;

б) когда мишенью в инфекционном микроорганизме являются его отдельные структуры (клеточная стенка, бактериальные ферменты и другие формы). При этом они должны существенно отличаться от человеческих. Например, у человека нет химических структур, специфических для бактериальной клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевая кислота) и цитоплазматической мембраны отдельных видов (липополисахарид).

Водорастворимость. Антибиотик должен быть водорастворим, чтобы транспортироваться через биологические жидкости тела в места инфекции.

Минимум побочных проявлений. Побочные проявления антибиотика должны быть минимальными. Их наличие абсолютно не исключается и регламентировано инструкцией по медицинскому применению лекарственного препарата. Наиболее часто это возможные аллергические реакции и неблагоприятное взаимодействие с пищей и другими лекарственными средствами, которые принимает пациент.

Низкая стоимость. Доступность антибиотиков для пациентов зависит от стоимости производства, которая должна быть достаточно низкой, чтобы они смогли их приобрести.

Медленное развитие устойчивости. Медленное развитие устойчивости зависит не только от

характеристик антибиотика, но и от частоты его применения.

Стабильность/ Биостабильность. Желательно чтобы препарат в процессе производства и хранения был стабилен при комнатной температуре. Некоторые антибиотики требуют режима холодильника. Находясь в теле пациента антибиотик должен определённое время не разрушаться, чтобы эффективно выполнить свою миссию.

Для идеального антибиотика разрушение в печени и выведение почками должны быть медленными. Это зависит не только от природы антибиотика и его характеристик, но и от частоты применения.

Достоверно известно, что антибиотики работают против бактерий, грибов и паразитов, но они не эффективны против вирусов. Эти лекарственные средства преимущественно используют для лечения бактериальных инфекций. Антибиотики путём блокирования у бактерий жизненных процессов убивают их или останавливают рост. Таким образом, по своей природе они могут быть бактерицидными или бактериостатическими. В случае способности действовать на широкий круг бактерий, антибиотик называют препаратом широкого спектра (амоксциллин и гентамицин). Если антибиотик действует только в отношении нескольких типов бактерий, его классифицируют как препарат узкого спектра (бензилпенициллин).

В целом антибактериальная активность антибиотиков осуществляется с помощью следующих механизмов:

- подавление синтеза клеточной стенки;
- нарушение целостности клеточной мембраны;
- подавление белкового синтеза;
- подавление синтеза нуклеиновых кислот.

В свете современных знаний антибактериальные лекарственные средства — это химические соединения, которые убивают или подавляют рост бактерий. В практике термин «антибиотик» часто применяется как синоним «антибактериальный». Исторически термин «антибиотик» первоначально обозначал антибактериальные соединения микробного, т.е. природного происхождения. Синтетических антибиотиков на тот момент практически не было [7].

Бактериальные пробиотики

В последние годы сформировалась сфера науки, изучающая пробиоз. Препараты с пробиотической активностью — пробиотики, пребиотики, синбиотики и метабиотики получили коммерческое продвижение как продукты потребления и средства поддержания здоровья человека и животных.

За прошедшие полвека смысловое наполнение термина «пробиотики» получило около двух

десятков литературных редакций. В нашей стране наиболее известны следующие варианты.

Определение. 1) «Пробиотики — живые микроорганизмы, приём которых в адекватных количествах оказывает благоприятное воздействие на организм хозяина» (FAO, 2001) [8, 9].

2) «Пробиотики — препараты из живых микроорганизмов и веществ микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения позитивное действие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через оптимизацию его микробной экологической системы» [10].

Первое определение имеет международный статус, а второе — национальный. Их соседство не паритет, а некий консенсус в понимании проблемы пробиоза отечественными исследователями и зарубежными коллегами.

Одним из исторических синонимов термина «пробиотик» является термин «биотерапевтический агент», который был предложен для обозначения микроорганизмов со специфическими терапевтическими свойствами, направленными на подавления роста патогенных бактерий [11].

Требования к «идеальному» пробиотику [12]:

1. Происходить из состава нормальной микробиоты кишечника человека.
2. Не должен обладать патогенными свойствами и передавать устойчивость к антибиотикам.
3. Быть стабильным в кислой среде желудка и устойчивым к действию желчи, кислорода и ферментов.
4. Проявлять высокую адгезивную активность к кишечному эпителию.
5. Вырабатывать антимикробные вещества для укрепления кишечного барьера.
6. Быть безопасным при употреблении и оказывать оздоровительный эффект.

Оценка биотерапевтической активности пробиотических культур тесно сопряжена с предполагаемыми механизмами лечебного или оздоровительного эффекта. Адресное воздействие может быть как на уровне одного органа, так и системно. Применительно к ЖКТ это, прежде всего, различные физиологические состояния и заболевания желудка, печени и кишечника. Границы воздействия пробиотиками условны, т. к. все органы и ткани человека взаимосвязаны. Поэтому уместно добавить, что даже локальные изменения органов ЖКТ могут иметь системные клинические проявления. Наиболее известные механизмы действия пробиотиков предполагают наличие:

- активности в отношении поддержания или модулирования микробиоты кишечника;
- контроля оппортунистических патогенов;
- стимулирования иммунитета;
- клеточной пролиферации/дифференциации эпителия слизистых;

- усиления целостности кишечного барьера.

Клиническая эффективность пробиотического штамма зависит от суточной дозы пробиотика (от того, какое количество КОЕ жизнеспособных бактериальных клеток пациент принимает за сутки). При этом учитывается, что полезный эффект пробиотика имеет видоштаммоспецифичный, а не только дозозависимый характер. Пробиотические штаммы реализуют свои позитивные эффекты посредством различных механизмов, которые при этом являются уникальными для каждого из них [13].

Достоверность, профиль безопасности и эффективности рассматриваются как фундаментальные требования для разработки, производства и продвижения препаратов с пробиотической активностью. Основные формы выпуска пробиотиков: капсулы, саше или в составе пищевых продуктов.

Современные бактериальные пробиотики главным образом являются представителями рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, которые не обладают патогенными характеристиками. Пробиотические штаммы относительно редко причастны к оппортунистическим инфекциям [14]. Это, как правило, наблюдается у пациентов с нарушенным иммунитетом или у больных гепатитом [15].

Применительно к материалам этой публикации здесь акцентируется внимание на бактериальных пробиотических препаратах как доминирующей группе медицинских пробиотиков на российском фармацевтическом рынке.

Наиболее используемыми бактериальными видами пробиотических культур являются те, которые особо тщательно проверены в клинических и лабораторных исследованиях. Это *Lactobacillus acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L.casei*, *L.gasseri*, *L.plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B.lactis*, *B.longum*, *Enterococcus faecium*. Указанные культуры широко известны и имеют длительный период коммерческого обращения. База данных по изучению эффективности и безопасности *L.johnsonii*, *L.reuteri*, *L.rhamnosus*, *B.breve*, *B.infantis*, *E.faecalis*, *Streptococcus salivarius*, используемых в качестве пробиотических микроорганизмов, относительно меньше.

Идентификация и классификация микроорганизмов являются отправной точкой для изучения микробных характеристик. Точные и современные методы должны подтвердить идентичность каждого коммерческого пробиотического штамма. Эксперты FAO/ВОЗ по пробиотикам рекомендуют вначале идентифицировать культуру с помощью фенотипических тестов, а затем провести генетическую идентификацию с помощью ДНК-ДНК гибридизации, 16S рРНК секвенирования и других одобренных методов [9]. Установление подлинной идентичности микроорганизма является первым шагом к оценке его безопасности и эффективности. Подлинная видовая иденти-

фикация крайне важна для подтверждения пробиотической активности, которая является штаммоспецифической и, таким образом, требует идентификации микроорганизма на уровне штамма.

В настоящее время перечень видов пробиотических микроорганизмов стал разнообразнее. В составе пробиотических продуктов используют культуры *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, а также представителей других таксономических групп (пропионобактерии, бациллы, отдельные штаммы непатогенной кишечной палочки, грибы-сахаромицеты). Однако более широкое видовое представительство потенциальных пробиотических микроорганизмов в действительности ограничено объективной реальностью.

В то время как лактобациллы, бифидобактерии, лактококки и грибы позиционируются как пробиотические организмы GRAS (Generally recognized as safe) группы (пробиотики хорошо изучены в клинических исследованиях и «широко признаны как безопасные» по решению FDA), другие пробиотики по своим характеристикам не могут быть туда включены. Это относится к некоторым энтеробактериям и энтерококкам, штаммы которых способны проявить пробиотическую активность. В ЕС функции, подобные FDA, осуществляет Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA), которое устанавливает безопасность пробиотиков в рамках QPS (Qualified Presumption of Safety), т.е. в соответствии с квалифицированной презумпцией безопасности. Например, по мнению экспертов EFSA статус «безопасных» имеют около 50 видов из числа *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Propionibacterium freudenreichii* и *Streptococcus thermophilus*.

Существует список микроорганизмов с продолжительной и достаточно безопасной историей пищевого применения. Он одобрен европейскими регулирующими органами и включает также преимущественно лактобациллы и бифидобактерии. В отдельных странах континентальной Европы пробиотики считаются лекарствами, и их назначают наряду с антибиотиками. В других странах пробиотики продают как пищевые добавки и отпускают без рецепта. К сожалению, повсеместно предлагаемые препараты типа «биойогуртов», не всегда содержат пробиотические штаммы, которые были бы клинически полезными [16].

Более того, исследования в рамках ЕС установили, что 28% пробиотических культур, используемых производителями и дистрибьюторами в коммерческих целях, не соответствуют заявленной паспортизации (неправильно идентифицированы) [17].

Существует одна сложная проблема у бактериальных пробиотических культур — это риск передачи устойчивости к антимикробным сред-

вам другим микроорганизмам. Факт распространения генов антибиотикоустойчивости у микрофлоры кишечника и в пищевой цепочке стал известен еще 20 лет тому назад [18–20]. Риск является реальным как в настоящее время, так и на перспективу. Следовательно, если пробиотические бактерии несут в себе гены приобретённой резистентности, они могут их передать патогенным штаммам или микроорганизмам микробиоты кишечника. В частности, некоторые лактобациллы и энтерококки, обладая плазмидами, включающими гены антибиотикорезистентности, осуществляют их горизонтальный перенос другим бактериям. Микробиота человека включает многие бактериальные виды, которые способны воспринимать чужой генетический материал в форме ДНК. Этот процесс на регулярной основе может реализовываться между бактериями кишечника человека.

Теория и практика совместного применения антибиотиков и пробиотиков

Наиболее часто применяемые в медицинской практике антибиотики: β -лактамы, макролиды, сульфаниламиды и хинолоны, которые также иногда применяются в комбинациях [21, 22]. Выбор антибиотика зависит от типа микроорганизма, наиболее часто ассоциируемого с данным заболеванием. Пробиотические и патогенные микробы отличаются по уровню и спектру антибиотикочувствительности. На эффективность пробиотиков могут повлиять генетические особенности кишечной микробиоты конкретного субъекта, окружающие факторы, диета и применение антибиотиков. Инфекционная диарея традиционно является мишенью для пробиотиков. Следовательно, приём пробиотиков при антибиотикоассоциированной диарее (ААД) теоретически казался бы логичен, так как теоретически может помочь снизить риск диареи. Подобный сюжет это финальная часть неудачного течения антибиотикотерапии исходного инфекционного заболевания. В медицинской практике вопрос о безопасной антибиотикотерапии возникает на этапе подбора антимикробного средства и комплементарного ему пробиотического препарата с целью снижения риска возникновения нежелательных проявлений, в том числе и в форме ААД. Этот тезис наиболее заманчив с точки зрения получения максимального лечебного эффекта при минимальных финансовых затратах на медицинское и фармацевтическое сопровождение целевой антибиотикотерапии. Однако материал официальной инструкции по медицинскому применению пробиотического бактериального лекарственного препарата редко содержит необходимую информацию о спектре и уровне антибиотикочувствительности

производственных культур препарата к большинству назначаемых антибиотиков. В то же время актуализированные данные по таксономическому положению пробиотических штаммов-продуцентов и спектру их чувствительности к ряду антибиотиков (к сожалению, редко используемых) могут присутствовать только в нормативной документации (НД), которая является конфиденциальной, т.е. недоступной для практикующих врачей.

Указанные сведения крайне необходимы специалистам для рациональной оценки на этапе планирования сочетанной антибиотико- и пробиотикотерапии с целью повышения эффективности этиотропного лечения и профилактики побочных проявлений вследствие дисбиотических нарушений нормальной микробиоты. Инициативные попытки отдельных исследователей получить необходимую информацию собственными силами приводят к неоднозначным результатам и выводам. Иногда они просто парадоксальны по отношению к НД производителя бактериального пробиотического лекарственного средства.

Ниже в формате дайджеста приводятся данные ряда клинико-лабораторных исследований, посвящённых паспортизации и определению профиля чувствительности (устойчивости) ряда коммерческих пробиотических культур из состава лекарственных препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации и за рубежом.

Исследование № 1.

***Lactobacillus casei* вариант *rhamnosus* Döderlein (Lcr35).** А. М. Савичева и Е. В. Рыбина [23] с помощью диско-диффузионного метода определили спектр антибиотикочувствительности пробиотического штамма *Lactobacillus casei* вариант *rhamnosus* Döderlein (Lcr35), входящего в состав коммерческого лекарственного препарата. В набор для определения антибиотикорезистентности лактобацилл были включены диски, содержащие следующие антимикробные средства: пенициллин, ампициллин, амоксициллин + клавуланат, карбенициллин, гентамицин, нетилмицин, хлорамфеникол, офлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, цефазолин, цефтазидим, цефотаксим, эритромицин, азитромицин, клиндамицин, метронидазол. По версии авторов, это наиболее часто назначаемые в гинекологической практике антибактериальные препараты.

Исследователи установили, что пробиотическая культура Lcr35 была чувствительной к пенициллину, ампициллину, амоксициллин + клавуланату, карбенициллину, гентамицину, нетилмицину, хлорамфениколу, офлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину. Изученные лактобациллы оказались резистентными к цефазолину, цефтазидиму, цефотаксиму, эритромицину, азитромицину, клиндамицину и метронидазолу.

Авторская интерпретация полученных результатов неоднозначна. Во-первых, исследователи считают, что данные лактобациллы чувствительны к пенициллинам только на основании грамположительного варианта организации клеточной стенки. По их мнению, подобное характерно для всех грамположительных бактерий. Но возникает вопрос, почему этот принцип не применим к цефалоспорином? Они оказались неактивны в отношении Lcr35, несмотря на то, что работают по идентичному с пенициллинами антибактериальному механизму в отношении грамположительных бактерий. Во-вторых, результат по устойчивости аэробной культуры Lcr35 к метронидазолу был *a priori* очевиден и абсолютно ожидаем, так как 5-нитроимидазол действует только на строгие анаэробные микроорганизмы [24]. Кроме того, при оценке активности клиндамицина по отношению к лактобациллам необходимо учитывать его реальные концентрации во влагалищной жидкости как при системном, так и при местном применении антибиотика. Они могут существенно превышать референтные значения видовых МИК лактобацилл.

Постановка теста на чувствительность к антибиотикам и оценка результатов предусматривает изучение наиболее распространённых внебольничных и внутрибольничных патогенов, перечень которых приводится в нормативных документах (НД) производителя конкретного препарата. Например, в РФ подобная информация по препаратам левофлоксацина в отношении лактобацилл отсутствует [25, 26]. Кстати клиническая интерпретация антибиотикочувствительности (устойчивости) лактобацилл достаточно редкое событие, так как они крайне редко причастны к патологическим процессам. Следовательно, и референтная база по спектру чувствительности к антибиотикам клинически значимых штаммов лактобацилл объективно ограничена.

При проведении и планировании работ подобных исследований А. М. Савичевой и Е. В. Рыбиной целесообразнее руководствоваться показателями, методами и нормативами НД конкретного пробиотического лекарственного препарата. При отсутствии необходимых материалов следует ориентироваться на требования и критерии EFSA (Европейского управления безопасности пищевых продуктов) по оценке пробиотических штаммов лактобацилл, в том числе и при определении спектра и уровня чувствительности к антибиотикам.

Исследование № 2.

***Enterococcus faecium*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum*.** Группа исследователей [27] (М. В. Сухорукова, А. В. Тимохова, М. В. Эйдельштейн, Р. С. Козлов, 2012) из НИИ антимикробной терапии (Смоленск, Россия) провела комплексное изучение нескольких партий (серий)

широко распространённого в России коммерческого лекарственного препарата П N012084/01.

С помощью микробиологических исследований были изучены таксономические характеристики и установлена видовая принадлежность пробиотических бактериальных культур. Дополнительно авторы определили уровень и спектр антибиотикочувствительности штаммов *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum* из состава препарата. Все выделенные культуры с высокой степенью достоверности были идентифицированы до вида. При определении чувствительности производственных штаммов к девяти антибиотикам и одному сульфаниламиду в пределах тестируемых концентраций, индивидуальные значения МПК антимикробных средств практически совпадали с видовыми медианами энтерококков, лактобацилл и бифидобактерий. При этом, по данным исследователей, штаммы *Enterococcus faecium* были резистентны только к ампициллину и ципрофлоксацину, а *Lactobacillus gasseri* соответственно к гентамицину, эритромицину, тетрациклину и хлорамфениколу (по версии EUCAST/EFSA).

Культуры *Bifidobacterium longum* были чувствительны ко всем исследованным антимикробным средствам, т.е. к ампициллину, ампициллину/сульбактаму, ванкомицину, гентамицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину и триметоприму/сульфаметоксазолу. Сконцентрировав своё внимание главным образом на потенциальной угрозе распространения устойчивости с участием бактериальных пробиотиков из этого коммерческого продукта, исследователи не отметили самое существенное. При установленном спектре и уровню чувствительности производственных штаммов *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum* к большинству применяемых в медицинской практике антибиотиков целесообразность приёма данного лекарственного препарата во время антибиотикотерапии крайне сомнительна. Пробиотические бактерии просто погибли, т.к. на современном фармацевтическом рынке по-прежнему доминируют β -лактамы, преимущественно пенициллины, макролиды и цефалоспорины [21].

Применительно к анализу вышеизложенных материалов была рассмотрена гипотетическая ситуация нежелательного взаимодействия пробиотика и антибиотика в толстой кишке. В качестве модели был избран пробиотический препарат содержащий живые лактобациллы, бифидобактерии и энтерококки и антибиотик амоксициллин для перорального применения. Данный выбор был обусловлен доминирующим положением указанных средств в медицинской практике. Например, в недавнем когортном исследовании при острых респираторных инфекциях семейные вра-

чи назначают антибиотики 65% пациентам. При этом в 51% случаев лечение проводилось амоксициллином. Бензилпенициллин или феноксиметилпенициллин и эритромицин пациенты принимали, соответственно, в 17,0 и 12,7% случаев [28]. Амоксициллин — полусинтетический антибиотик, аналог ампициллина. Имеет расширенный спектр бактерицидной активности в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [30]. Приоритет пенициллинов в целом и амоксициллина в частности очевиден и с позиции самых продаваемых амбулаторных антибиотиков в РФ. В 2015—2017 гг. ежегодные продажи амоксициллина превысили 25 млн упаковок [29].

Принимая во внимание расчёты в материале А. А. Юрятина 2017 [2], можно отметить, что концентрации антибиотика в толстой кишке могут теоретически в 13—162 раза превышать его свободную концентрацию в крови. Дополнительно надо учитывать, что 10—20% системного амоксициллина выводится печенью. Эта часть антибиотика также со временем окажется в толстой кишке. Удивительно, но амоксициллин путём воздействия на микрофлору кишечника, снижает реабсорбцию других лекарственных средств, принятых перорально [30]. В итоге можно ожидать достаточно высокие концентрации амоксициллина в кишечнике. По версии EUCAST (2018), это количество более чем в 20 раз превысит порог регламентированной резистентности (МПК 8 мг/л) для пробиотических бифидобактерий, лактобацилл и энтерококков. В таких условиях следует ожидать определённое снижение эффективности лекарственной пробиотикотерапии с использованием указанных бактериальных культур.

Исследование № 3.

***Escherichia coli* штамм Nissle 1917.** Не менее красноречивыми являются материалы по чувствительности представителя непатогенных кишечных палочек — *Escherichia coli* штамм Nissle 1917. Это один из наиболее клинически изученных в мире пробиотических штаммов в составе коммерческих препаратов [31]. В обзорной статье турецких исследователей S. Altuntaş, M. Korukoğlu, V. Altuntaş представлены комплексные материалы по различным аспектам изучения и применения пробиотического штамма EcN (*Escherichia coli* Nissle 1917) [32]. В части профиля чувствительности культуры к антибиотикам следует обратить внимание на следующие данные. Из 36 испытанных антибиотиков только к 9 наименованиям установлена устойчивость пробиотической культуры, которая была вполне ожидаемой, т.к. имела преимущественно фенотипический характер (таблица). Не трудно заметить, что *in vitro* штамм был чувствителен к 27 антибиотикам из числа доминирующих на фармацевтическом рынке классов антимикробных препаратов. Совершенно очевидно,

Спектр антибиотикочувствительности пробиотического штамма *Escherichia coli* штамм Nissle 1917 (модифицировано из [32, 33])

Класс антибиотиков	Чувствителен	Устойчив
Пенициллины	Ампициллин, амоксициллин/клавуланат, азлоциллин, мезлоциллин, пиперациллин, тикарциллин	Бензилпенициллин
Цефалоспорины	Цефалотин, цефазолин, цефаклор, цефотаксим, цефтриаксон, латамоксеф, цефоперазон	Цефсулодин
Карбапенемы	Имипенем	
Аминогликозиды	Стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин	
Хинолоны	Пипемидовая кислота, норфлоксацин, цiproфлоксацин	
Тетрациклины	Тетрациклин, доксициклин	
Макролиды		Эритромицин
Рифамицины	Рифампицин	Рифампицин (вариабельная чувствительность)
Линкозамиды		Клиндамицин
Нитроимидазолы		Метронидазол
Гликопептиды		Ванкомицин, тейкопланин
Сульфаниламиды	Триметоприм/сульфаметоксазол	
Нитрофураны	Нитрофурантоин	
Стрептограмин		Хинупристин/дальфопристин
Другие группы	Хлорамфеникол	

что совместный приём пробиотических препаратов, содержащих штамм *Escherichia coli* штамм Nissle 1917, и указанных выше 27 антибиотиков однозначно приведёт к существенному снижению качества пробиотикотерапии.

Заключение

Представленные выше данные исследований по паспортизации и определению профиля чувствительности (устойчивости) ряда коммерческих пробиотических культур из состава лекарственных препаратов свидетельствуют о ряде не до конца решённых вопросов. Известно, что в последние годы происходит активный процесс реклассификации многих грамположительных неспорообразующих палочек [34, 35]. Благодаря применению современных молекулярных инструментов идентификации микроорганизмов часть лактобацилл была реклассифицирована. Произошли изменения в таксономии широко известных видов лактобацилл. Так, исходя из генетических характеристик, прежний вид *Lactobacillus acidophilus* распределился, главным образом, между видами *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus crispatus*. *Lactobacillus fermentum* отнесли к *Lactobacillus reuteri*, а штаммы *Catenabacterium cateniforme* идентифицировали как *Lactobacillus ruminis* [36, 37].

В силу разных причин, некоторые коммерческие пробиотические штаммы лактобацилл по-прежнему не актуализированы в формате современной генотипической классификации [38]. Это создаёт постоянную путаницу в оценке характеристик (в т.ч. и по спектру антибиотикоустойчивости) коллекционных штаммов лактобацилл, находящихся в обращении со старыми и новыми видовыми названиями [39]. Стало очевидным, что если не применить современные молекулярные методы идентификации, могут возникнуть трудности в таксономическом позиционировании пробиотических лактобацилл, так как неко-

торые из них являются строгими анаэробами, а другие — факультативными анаэробами [40].

Изучение чувствительности лактобацилл к антибиотикам это отдельная самостоятельная проблема. Известно, что ряд видов требуют для своего роста сложных сред и специальных условий культивирования. Более того, параметры показателей pH и Eh, а также некоторые компоненты из состава питательных сред, могут непосредственно воздействовать на исследуемый субстрат, в том числе и на антибиотики. Например, антимицробную активность метронидазола следует изучать в строгих анаэробных условиях, аминогликозидов — в присутствии молекулярного кислорода, а клиндамицина — независимо от характеристик атмосферы культивирования. В настоящее время применение классического диско-диффузионного метода для изучения антибиотикочувствительности анаэробов считается неадекватным [41].

Особое место занимают методы изучения и критерии интерпретации результатов тестов на чувствительность к антибиотикам клинически значимых микроорганизмов. Они могут иметь национальный, континентальный или интерконтинентальный уровень распространения и применения. В США это формат требований CLSI [42], в Европе — EUCAST [43] и в РФ — МУК [44]. Вопросы гармонизации этих документов находятся на самой ранней фазе рассмотрения. Учитывая ограниченную информацию по чувствительности лактобацилл из состава лекарственных средств, оценку результатов проводят по критериям, предназначенным для пищевых лактобацилл в рамках требований и критериев EFSA (Европейского управления безопасности пищевых продуктов).

Статья подготовлена при поддержке ООО «Тева», 115054, Россия, Москва, ул. Валовая 35, тел.: +7 (495) 644-22-34, факс: +7 (495) 644-22-35, www.teva.ru HLKF-RU-00358-Pharm-НСР. На правах рекламы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочеровец В.И. Хилак форте: современная модель метабиотика с биотерапевтической активностью. Монография по продукту. — М.: ООО «Прайм-Медиа», 2018. — 72 с. / Kocherovets V.I. KHilak forte: sovremennaya model' metabiotika s bioterapevticheskoy aktivnost'yu. Monografiya po produktu. M.: ООО «Prajm-Media», 2018; 72. [in Russian]
2. Юратин А.А. Легко ли ужиться антибиотикам и пробиотикам в кишечнике? Спросим у фармакокинетики. Практика педиатра. — 2017. — № 1. — С. 58—64. / Yuryatin A.A. Legko li uzhit'sya antibiotikam i probiotikam v kishechnike? Sprosim u farmakokinetiki. Praktika pediatri 2017; 1: 58—64. [in Russian]
3. Кира Е.Ф. Пробиотики в восстановлении микробиоценоза влагалища. Акушерство и гинекология. — 2017. — № 5. — С. 32—8. DOI:10.18565/aig.2017.5.32-8 / Kira E.F. Probiotiki v vosstanovlenii mikrobiocenoza vlagalishcha. Akusherstvo i ginekologiya 2017; 5: 32—8. DOI:10.18565/aig.2017.5.32-8 [in Russian]
4. Государственный реестр лекарственных средств 2018. <http://grls.rosminzdrav.ru>. Дата обращения 05.03.2018. / Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv 2018. <http://grls.rosminzdrav.ru>. Data obrashcheniya 05.03.2018. [in Russian]
5. Anderson D., ed. Dorland's Illustrated Medical Dictionary. 30th ed. Saunders; 2003.
6. Bhattacharjee M.K., ed. Chemistry of Antibiotics and Related Drugs. Springer; 2016: 219.
7. Technavio. Global Antibiotics Market 2014—2018. Report. www.technavio.com/report/global-antibiotics-market-2014-2018
8. Guarner F., Schaafsma G.J. Probiotics. Int J Food Microbiol. 1998; 39 (3): 237—238.
9. FAO/WHO working group. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina; 2001.
10. Отраслевой стандарт введен в действие ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ Минздрава России от 9 июня 2003 г. № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». / Otrasevoj standart vveden v dejstvie OST 91500.11.0004-2003. Priказ Minzdrava Rossii ot 9 iyunya 2003 g. № 231 «Ob utverzhdenii otrasevogo standarta «Protokol vedeniya bol'nykh. Disbakterioz kishechnika». [in Russian]
11. Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 2001; 357 (9262): 1076—1079.
12. Govender M., Choonara Y.E., Kumar P., du Toit L.C., van Vuuren S., Pillay V. A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. AAPS Pharm Sci Tech 2014; 15 (1): 29—43.
13. Penner R., Fedorak R.N., Madsen K.L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. Curr Opin Pharmacol 2005; 5 (6): 596—603.
14. Douillard F.P., de Vos W.M. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. Microb Cell Fact 2014; 13: Suppl 1: S8.
15. Besselink M.G., van Santvoort H.C., Buskens E. et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2008; 371 (9613): 651—659.
16. D'Souza A.L., Rajkumar C., Cooke J., Bulpitt C.J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. BMJ 2002; 324 (7350): 1361.
17. Salminen S., von Wright A. Probiotics: safety and efficacy. In: Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright, eds. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 4th ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group; 2012; 689—704.
18. Sommer M.O.A., Dantas G., Church G.M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. Science. 2009; 325 (5944): 1128—1131.
19. Davies J. Antibiotic resistance in and from nature. Microbiol Spectrum 2013; 1(1): OH-0005-2012. doi:10.1128/microbiolspec.OH-0005-2012.
20. Sommer M.O., Church G.M., Dantas G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. Virulence 2010; 1 (4): 299—303.
21. Demain A.L., Lancini G. Bacterial pharmaceutical products. In: Dworkin M. et al., eds. The Prokaryotes. A Handbook of the Biology of Bacteria. 3rd ed. Singapore: Springer; 2006; 810—831.
22. Bell B.G., Schellevis F., Stobberingh E., Goossens H., Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. BMC Infect Dis 2014; 14: 13.
23. Савичева А.М., Рыбина Е.В. Исследование *in vitro* роста, размножения, антибиотикорезистентности, конкурентных взаимоотношений штамма *Lactobacillus casei rhamnosus*. Акушерство и гинекология. — 2014. — № 7. — С. 79—83. / Savicheva A.M., Rybina E.V. Issledovanie *in vitro* rosta, razmnozheniya, antibiotikorezistentnosti, konkurentnykh vzaimootnoshenij shtamma *Lactobacillus casei rhamnosus*. Akusherstvo i ginekologiya. 2014; 7: 79—83. [in Russian]
24. Кочеровец В.И. Ещё раз об известном. Акушерство и гинекология. 2009; 3: 66—68. / Kocherovets V.I. Eshche raz ob izvestnom. Akusherstvo i ginekologiya. 2009; 3: 66—68. [in Russian]
25. Кочеровец В.И. Глево: современная таблетированная форма левофлоксацина системного действия: монография по продукту. — М. — СПб.: Полифорум, 2015. — 79 с. / Kocherovets V.I. Glev: sovremennaya tabletirovannaya forma levofloksacina sistemnogo dejstviya: monografiya po produktu. M.: — Spb.: Poliforum, 2015; 79. [in Russian]
26. Кочеровец В.И., Буянтян Н.Д. Современные лекарственные препараты левофлоксацина в клинической практике: учебное пособие. — М. — СПб.: Полифорум, 2016. — С. 107. / Kocherovets V.I., Buniatyat N.D. Sovremennye lekarstvennyye preparaty levofloksacina v klinicheskoy praktike: uchebnoye posobie. M.: Spb.: Poliforum, 2016; 107. [in Russian]
27. Сухорукова М.В., Тимохова А.В., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С. Чувствительность к антибиотикам штаммов бактерий, входящих в состав пробиотика «Линекс». Клинический микробиол и антимикроб химотер. — 2012. — Т. 14. — № 3. — С. 248—251. / Sukhorukova M.V., Timokhova A.V., EHjdel'shtejn M.V., Kozlov R.S. CHuvstvitel'nost' k antibiotikam shtammov bakterij, vkhodjashchikh v sostav probiotika «Lineks». Klin mikrobiol i antimikrob khimioter 2012; 14: 3: 248—251. [in Russian]
28. Meropol S.B., Localio A.R., Metlay J.P. Risks and benefits associated with antibiotic use for acute respiratory infections: a cohort study. Ann Fam Med 2013; 11 (2): 165—172.
29. Данные IQVIA™, 2018. / Dannye IQVIA™, 2018. [in Russian]
30. Инструкция Амоксил США. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/050542s026s027s028,050754s013s014s017,050760s012s013s015,050761s012s013s0151bl.pdf / Instrukciya Amoksil SSHA. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/050542s026s027s028,050754s013s014s017,050760s012s013s015,050761s012s013s0151bl.pdf [in Russian]
31. Babickova J., Gardlik R. Pathological and therapeutic interactions between bacteriophages, microbes and the host in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2015; 21 (40): 11321—11330.
32. Altuntaş S., Korukluoğlu M., Altuntaş V. Probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. Pamukkale Univ Muh Bilim Derg 2017; 23 (7): 933—940. doi: 10.5505/pajes.2017.98475.
33. Sonnenborn U., Schölze J. The non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917 — features of a versatile probiotic. Microb Ecol Health Dis 2009; 21 (3—4): 122—158.
34. Vos P., Garrity G., Jones D., eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3: The Firmicutes. 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag; 2009; 1450.
35. Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. Manual of Clinical Microbiology. Systems for Detection and Identification of Bacteria and Yeasts. Vol 1. ASM Press. 2011.
36. Mitsuoka T. The human gastrointestinal tract. In: Wood BJB. The Lactic Acid Bacteria. Vol. 1. Boston, MA: Springer; 1992; 69—114.
37. Reuter G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. Curr Issues Intest Microbiol 2001; 2 (2): 43—53.
38. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Тверь: Ред.из. центр Твер.гос.мед.ун-та, 2016. — 214 с. / Chervinec Yu.V., Chervinec V.M., Mironov A.Yu. Simbioticheskie vzaimootnosheniya laktobacill i mikroorganizmov zheludochno-kishechnogo trakta. Tver': Red.iz. centr Tver.gos.med.un-ta, 2016; 214. [in Russian]
39. Ботина С.Г. Реклассификация отечественных производственных культур бактерий рода *Lactobacillus* и сравнительная характеристика их технологических свойств. Материалы II Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» Ростов-на-Дону, сентябрь 2009. — С. 10. / Botina S.G. Reklassifikaciya otechestvennykh proizvodstvennykh kultur bakterij roda *Lactobacillus* i sravnitel'naya kharakteristika ikh tekhnologicheskikh svoystv. Materialy II Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Aktual'nye problemy biologii, nanotekhnologii i mediciny» Rostov-na-Donu, sentyabr' 2009; 10. [in Russian]
40. Winn W.C. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins; 2017.
41. Brook I., Wexler H.M., Goldstein E.J. Antianerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2013; 26 (3): 526—546.

42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-838-X [Print]; ISBN 1-56238-839-8 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.
43. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. 15 May 2018.
44. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04. Клинико-микробиологический антимикробный химиотерапевтический журнал. — 2004. — Т. 6. — № 4. — С. 306—359. / Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2004; 6: 4: 306—359. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кочеровец Владимир Иванович — д.м.н., профессор, профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Минздрава России.

Выбор метода определения бактериальных эндотоксинов

О. В. ШАПОВАЛОВА, Н. П. НЕУГODOVA, Г. А. САПОЖНИКОВА

Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва

Choosing Bacterial Endotoxin Detection Method

O. V. SHAPOVALOVA, N. P. NEUGODOVA, G. A. SAPOZHNIKOVA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow

Для обнаружения и количественного определения бактериальных эндотоксинов используются различные методы испытаний: гель-тромб тест, который является арбитражным и основан на образовании геля, а также фотометрические (инструментальные) методы, определяющие интенсивность окраски или мутности в испытуемых растворах. В настоящей статье рассматриваются особенности современных методов обнаружения бактериальных эндотоксинов, их преимущества и недостатки. На основании информационного анализа и практического опыта установлены основные критерии выбора метода определения пирогенных примесей. Гель-тромб тест и фотометрические определения бактериальных эндотоксинов достаточно надёжны и воспроизводимы. При наличии необходимого оборудования и реактивов выбор остаётся за аналитиком. В единичных случаях применяют инструментальные методы благодаря их высокой чувствительности, позволяющей избежать влияния мешающих факторов в испытаниях ЛАЛ-теста.

Ключевые слова: бактериальные эндотоксины, гель-тромб тест, фотометрические методы, турбидиметрический, хромогенный, мешающие факторы.

Various test methods are used to detect and quantify bacterial endotoxins: a gel-clot test, which is arbitral and is based on the formation of a gel, and photometric (instrumental) tests that determine the intensity of the color or turbidity in the test solutions. In this article we consider the features of modern methods for detecting bacterial endotoxins, their advantages and disadvantages. Based on information analysis and practical experience, the main criteria for choosing a method for determining pyrogenic impurities are established. The gel-clot test and photometric determinations of bacterial endotoxins are sufficiently reliable and reproducible. The choice is left for the analyst when all necessary equipment and reagents are available. Instrumental methods are used in rare case due to their high sensitivity, which allows to avoid the influence of interfering factors in the LAL-test.

Keywords: bacterial endotoxins, gel-clot test, photometric methods, turbidimetric, chromogenic, interfering factors

Введение

В государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания в Общую Фармакопейную Статью (ОФС) «Бактериальные эндотоксины» впервые включены фотометрические методы. В статье наряду с визуальными методами А (качественный гель-тромбтест) и В (количественный гель-тромб тест) достаточно подробно описаны методы (С, D, E и F), которые в отличие от гель-тромб теста, позволяют количественно оценить содержание бактериальных эндотоксинов (БЭ) [1, 2]. Таким образом, предусмотрено четыре модификации фотометрических методов: турбидиметрические и хромогенные тесты, выполняемые способом кинетического определения или по конечной точке. Турбидиметрический метод основан на переходе в реакционную смесь коагулогена, содержащегося в ЛАЛ-реактиве, на коагулин-гель и помутнение её. Хромогенный — на окрашивании реакционной смеси после расщепления синтетического пептид-хро-

могенного комплекса, где коагулоген заменён на искусственный хромогенный субстрат. Хромогенный субстрат представляет собой простой полипептид с хромофором на конце [3].

Каждый из методов оценки БЭ имеет свои особенности, знание которых позволит выбрать оптимальный вариант для анализа испытуемого образца. Для принятия решения, каким методом проводить определение содержания БЭ в образцах лекарственного средства, следует ответить на следующие вопросы:

1. Какие предъявлены нормативные требования и норма предельного содержания БЭ, если таковые имеются?
2. Какое в наличии материально-техническое оснащение?
3. Каковы физико-химические свойства испытуемого образца (мутность, цвет, вязкость и пр.)?
4. Какое количество испытуемых образцов необходимо оценить одновременно?
5. Какая чувствительность метода требуется?
6. Есть ли необходимость в получении количественных результатов?
7. Есть ли необходимость в хранении результатов на электронном носителе [4]?

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 127051 Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2. НЦЭСМП

Гель-тромб тест (Методы А и В)

Наиболее распространённым в фармакопейном анализе способом определения содержания БЭ в лекарственных средствах является гель-тромб тест. В данной модификации результат реакции эндотоксина с ЛАЛ-реактивом оценивается визуально по образованию твёрдого геля, который остается на дне пробирки после её переворачивания на 180°C. В связи с тем, что концентрация БЭ, определяемая в ЛАЛ-тесте, зависит от чувствительности используемого ЛАЛ-реактива, минимальная измеряемая концентрация БЭ составляет 0,015 ЕЭ/мл, что соответствует максимальной чувствительности ЛАЛ-реактива ($\lambda=0,015$ ЕЭ/мл) [5].

Гель-тромб тест может быть выполнен в виде качественного анализа (метод А), устанавливающего соответствие образца заявленной норме предельного содержания БЭ, поэтому его часто называют «предельным» или «разрешающим/запрещающим». Концентрацию БЭ в испытуемых образцах можно определить методом В, например с помощью, двукратных разведений испытуемого образца [6].

Методы А и В являются наиболее доступными, для них не требуется считывающего прибора. Кроме того, выполнение гель-тромб теста возможно не только для истинных прозрачных и бесцветных растворов, но и для непрозрачных или окрашенных образцов, а так же для суспензий [7, 8].

Несмотря на большие преимущества метода А и В, гель-тромб тест имеет следующие ограничения:

- 1) не автоматизированный тест, где учёт результатов проводят визуально и интерпретируют субъективно;
- 2) невозможно определить точное содержание БЭ;
- 3) наличие значительной погрешности (двукратная ошибка опыта);
- 4) метод требует существенных финансовых и трудовых затрат при определении большого числа образцов лекарственных средств (на производстве).

Фотометрические методы

Для всех четырёх методов определения БЭ предусмотрены испытания с использованием фотометрического прибора (например, автоматический фотометр для микропланшет ELx808) и построением калибровочной кривой стандарта эндотоксинов в различных концентрациях. При этом целесообразно использовать программное обеспечение, которое позволяет фиксировать результаты и хранить их в дальнейшем на бумажном и/или электронном носителе.

Турбидиметрический метод с пределом обнаружения 0,01 ЕЭ/мл основан на развитии мутности реакционной смеси пропорционально увеличению концентрации БЭ, посредством высвобождения коагулогена из ЛАЛ-реактива. Испытуемые пробы переносят в ячейки микропланшета

и помещают его в прибор, где происходит считывание результатов. Оптимальная длина волны — 360 нм. Концентрация БЭ рассчитывается с учётом калибровочной кривой [9, 10].

Хромогенный тест, с пределом обнаружения 0,005 ЕЭ/мл, очень схож с турбидиметрическим с той лишь разницей, что для его проведения используется специальный ЛАЛ-реактив с хромогенным субстратом, благодаря которому измеряется интенсивность окрашивания реакционной смеси в жёлтый цвет.

Оба теста выполняют в двух модификациях: как кинетические или по конечной точке.

Методы по конечной точке (Е, F) это первые, из предложенных инструментальных методов. Применение их в настоящее время незначительно, и на практике применяют только хромогенный метод по конечной точке, например, для анализа иммунобиологических препаратов и препаратов крови. Испытания более трудоёмкие в исполнении, так как предусматривают строго регламентированное многократное добавление реактивов: для начала реакции ЛАЛ-реактива с БЭ и её остановки.

Кроме этого следует отметить и другие недостатки методов Е и F:

1. Узкий диапазон чувствительности (от 1,0 ЕЭ/мл до 0,1 ЕЭ/мл или от 0,1 ЕЭ/мл до 0,01 ЕЭ/мл), в соответствии с которыми требуются дополнительные разведения образцов.
2. Реагент для остановки реакции может вызвать выпадение осадка.
3. Возможны ошибки оператора в ходе трудоёмкого процесса.

В кинетических методах (С и D) фотометр измеряет оптическую плотность через фиксированные промежутки времени и определяет её изменение с меньшей погрешностью измерения по сравнению с гель-тромб тестом. Анализ считается завершённым, когда оптическая плотность достигает наименьшего значения концентрации БЭ на калибровочной кривой [11, 12].

Диапазон стандартной калибровочной кривой может составлять 100 ЕЭ/мл — 0,005 ЕЭ/мл, что позволяет определять БЭ в лекарственных средствах, обладающих мешающими факторами. Благодаря высокой чувствительности этих методов (С и D) факторы, усиливающие или ингибирующие реакцию с ЛАЛ-реактивом, возможно устранить с помощью разведений водой для ЛАЛ-теста, не превышая при этом значения максимально допустимого разведения (МДР).

Фотометрические методы анализа зависят от условий выполнения испытаний, таких же как и в гель-тромб тесте, и подвержены влиянию особых факторов, например, наличия пузырьков в ячейках микропланшета, мутности, вязкости раствора и т.п.

В результате теоретического и практического анализа всех характеристик методов ЛАЛ-теста

Основные критерии выбора метода определения БЭ

Критерии выбора	Гель-тромб тест	Инструментальные методы
Техническое оснащение	Инкубирующий прибор (термоблок)	Вертикальный фотометр для микропланшет с перемешиванием и подогревом
Свойства испытуемых образцов	Возможность определения БЭ в любом растворе	Сложно оценивать мутные, вязкие, цветные растворы и растворы, образующие пену
Кратность МДР и наличие мешающих факторов	Подвержен влиянию мешающих факторов	Высокая чувствительность позволяет увеличить кратность разведения и уменьшить влияние мешающих факторов
Количество испытуемых образцов	Количество, анализируемых образцов зависит от возможности инкубационного прибора (бани или термоблока)	На одном микропланшете можно оценить качество около 20 образцов
Наличие программного обеспечения	Не предусмотрено, только визуальная оценка результатов	Автоматический учёт; результаты фиксируются и архивируются с помощью компьютерной программы

можно установить несколько основных критериев выбора соответствующего теста для определения БЭ в конкретном испытуемом образце (таблица).

В случае сомнений или разногласий окончательное заключение принимают на основании результатов, полученных при проведении испытания методом А [1].

Заключение

Все методы достаточно надёжны и воспроизводимы. При наличии необходимого оборудования и реактивов выбор остаётся за аналитиком. В единичных случаях применяют инструментальные методы благодаря их высокой чувствительности, позволяющей избежать влияние мешающих факторов в испытаниях ЛАЛ-теста. Так, при определении БЭ в образцах лекарственных средств, где отмечаются значительное влияние мешающих факторов и норма с наименьшим значением предельного содержания БЭ (например, «Яблочная кислота», «Ян-

тарная кислота», «Йопромид») наиболее целесообразно применение высокочувствительных фотометрических кинетических методов. В опытах гель-тромб теста образцы данных лекарственных средств сложно оценивать в связи с небольшой кратностью разведения (небольшого значения максимально допустимого разведения) основных растворов и влиянием мешающих факторов.

Значительная экономия материальных ресурсов и трудозатрат наблюдается при использовании инструментальных методов на производстве или при одновременной оценке большого числа образцов одного и того же наименования.

В случаях, когда необходимо определение количественного содержания БЭ, преимущество однозначно на стороне инструментальных методов. Согласно современным требованиям к фиксации и учёту результатов будущее за фотометрическими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГФ XIII «Бактериальные эндотоксины» ОФС.1.2.4.0006.15 / GF XIII «Bakterial'nye endotoksiny» OFS.1.2.4.0006.15 [in Russian]
2. Неугодова Н.П., Рябцова М.С., Сапожникова Г.А. Основные требования к биологическим показателям при оценке качества лекарственных средств. Возможности валидации биологических методов контроля. Вестник Научного Центра Экспертизы Средств Медицинского Применения. — 2016. — № 3. — С. 3—7. / Neugodova N.P., Ryabtsova M.S., Sapozhnikova G.A. Osnovnye trebovaniya k biologicheskim pokazatelyam pri otsenke kachestva lekarstvennykh sredstv. Vozmozhnosti validatsii biologicheskikh metodov kontrolya. Vestniki Nauchnogo TSentra Ekspertizy Sredstv Meditsinskogo Primeneniya 2016; 3: 3—7. [in Russian]
3. Ситников А. Г., Травина Л.А., Багирова В.Л. ЛАЛ — тест. Современные подходы к определению пирогенности. М.: 1997. — С. 19—26. / Sitnikov A. G., Travina L.A., Bagirova V.L. LAL — test. Sovremennyye podkhody k opredeleniyu pirogennosti. M.: 1997; 19—26.
4. ResearchGate [Электронный ресурс] — Режим доступа: https://www.researchgate.net/publication/299507542_LAL_Choice_of_Test_Method — LAL: Choice of Test Method — (Дата обращения: 28.11.2017). [in Russian]
5. Sandle T. Pyrogens, Endotoxin and the LAL Test: An Introduction in Relation to Pharmaceutical Processing. Global BioPharmaceutical Resources Newsletter. 2012; 1—16.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шаповалова Ольга Владимировна — ведущий эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Неугодова Наталья Петровна — к. б. н., начальник лаборатории фармакологии Испытательного центра экспер-

6. Dawson M. E. A Wealth of Options Choosing an LAL Test Method. LALUpdate 1995; 13: 3: 6.
7. Joiner T. J., Kraus P.F., Kupiec T.C. Comparison of Endotoxin Testing Methods for Pharmaceutical Products. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 2002; 6: 6: 408—409.
8. Timothy J. Joiner, Paul F. Kraus, Thomas C. Kupiec, PhD «Comparison of Endotoxin Testing Methods for Pharmaceutical Products», International Journal of Pharmaceutical Compounding, Vol. 6 No. 6 November/December 2002, p.408—409.
9. Barnard Health Care [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.barnardhealth.us/limulus-amebocyte/overview-of-prominent-lal-tests.html> — Overview Of Prominent LAL Tests — (Дата обращения: 23.02.2017).
10. Berzofsky R. N. Endotoxin detection in pharmaceuticals and medical devices with kinetic-QCL, a kinetic-quantitative chromogenic limulus amebocyte lysate assay. ALTEX 1995; 12 (2): 93—97.
11. Williams K.L. Endotoxins Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation third Edition, 2007.
12. Bacterial endotoxins — Test methodologies, routine monitoring, and alternatives to batch testing, Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2002/R2010.

тизы качества ЛС, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Сапожникова Галина Алексеевна — ведущий эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Левифлоксацин: анализ информации об осложнениях фармакотерапии отечественной базы данных спонтанных сообщений

С. К. ЗЫРЯНОВ^{1,2}, К. Э. ЗАТОЛОЧИНА¹, И. Л. АСЕЦКАЯ^{1,3}

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва

³ Информационно-методический центр по экспертизе, учёту и анализу обращения средств медицинского применения Росздравнадзора, Москва

Levofloxacin: Analysis of Information on Adverse Reactions from Russian Spontaneous Report Database

S. K. ZYRYANOV^{1,2}, K. E. ZATOLOCHINA¹, I. L. ASETSKAYA^{1,3}

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow

² City Clinical Hospital No. 24 of the Moscow City Health Department, Moscow

³ Information and Methodological Center for Expert Evaluation, Recording and Analysis of Circulation of Medical Products, Moscow

В статье обсуждаются проблемы безопасности применения препарата левифлоксацин. Проведён анализ спонтанных сообщений российской базы данных за период 2009 по 2017 гг. Установлены значительные отличия в количестве репортируемой информации о НР при применении левифлоксацина разных производителей. Сообщения преимущественно (74,1%) содержали информацию о взрослых пациентах (18—64 лет). Четверть поступивших сообщений содержала информацию о серьёзных НР. Наибольший совокупный удельный вес составили нарушения со стороны кожи и подкожных тканей (32,5%), реакции гиперчувствительности (30,8%), нарушения органов ЖКТ (29,0%), общие расстройства и нарушения в месте введения препарата (26,3%). Полученные результаты могут свидетельствовать о разном профиле безопасности лекарственных препаратов даже в рамках одного международного непатентованного наименования.

Ключевые слова: левифлоксацин, фармаконадзор, нежелательные реакции, безопасность лекарственных средств.

The main objective of this study was to analyze the adverse drug reactions (ADRs) associated with the use of levofloxacin. We analyzed ADR reports submitted to the Russian Spontaneous Report Database from 2009 to 2017. A significant difference in the number of spontaneous reports between different brands of levofloxacin was detected. Almost three quarters (74.1%) of all ADRs occurred in adults (18—64 years of age). Approximately 24% of reported ADRs were serious including two fatal cases. The most frequently reported reactions to levofloxacin involved the skin disorders (32.5%), hypersensitivity reactions (30.8%), gastrointestinal disorders (29.0%), general disorders and administration site conditions (26.3%). The results obtained may indicate a different profile of drug safety, even within the same international nonproprietary name.

Keywords: levofloxacin, pharmacovigilance, adverse drug reactions, drug safety.

Фторхинолоны относят к одним из наиболее применяемых антибактериальных препаратов, что обусловлено их широким спектром антимикробной активности, благоприятной фармакокинетикой и хорошей переносимостью. Вместе с тем, известно, что безопасность любого противомикробного средства в значительной степени зависит от химической структуры конкретного лекарственного препарата (ЛП). Так, из-за проблем с безопасностью в пострегистрационном периоде в Европе и США были отозваны такие фторхинолоны, как тровафлоксацин (гепатотоксичность) и грепафлоксацин (удлинение интервала QT, развитие сердечных аритмий), в США также были

удалены из применения и другие — ломефлоксацин, спарфлоксацин и гатифлоксацин [1, 2].

В настоящее время на фармацевтическом рынке США осталось только 5 фторхинолонов, при этом две трети их назначений приходятся на препараты ципрофлоксацин и левифлоксацин. Кроме того, более благоприятное соотношение польза/риск левифлоксацина в сравнении с другими препаратами этой группы обуславливает продолжение роста назначений данного препарата [2, 3].

Левифлоксацин имеет более чем 20-летнюю историю применения. Характеризуется широким спектром антибактериального действия, включающим большое число грамположительных (Гр+) и грамотрицательных (Гр-) аэробных микроорганизмов, в том числе внутриклеточных возбудителей. Обладает оптимальным фармакокинетическим профилем, что обеспечивает высокие сыво-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. РУДН

Таблица 1. Удельный вес подозреваемых препаратов

Препарат	Число СС о НР	Число СС о СНР
	(% от общего количества сообщений)	(% от числа сообщений на препарат)
ЛФ1	259 (26,0)	73 (28,2)
ЛФ2	204 (20,4)	30 (14,7)
ЛФ3	78 (7,8)	22 (28,2)
ЛФ4	63 (6,3)	7 (11,1)
ЛФ5	34 (3,4)	13 (38,2)
ЛФ6	33 (3,3)	4 (12,1)
ЛФ7	27 (2,7)	4 (14,8)
Другие	236 (23,6)	62 (26,3)
ТН не указано	64 (6,4)	22 (34,4)

роточные и тканевые концентрации препарата, превышающие МПК₉₀ для многих микроорганизмов. Однако, как и при применении всех других лекарственных средств, применение левофлоксацина ассоциируется с возможным развитием нежелательных реакций (НР), в том числе очень редких серьезных нежелательных реакций (СНР). Такие НР удастся выявить по результатам пострегистрационных исследований и программы фармаконадзора при применении ЛП в широкой медицинской практике.

Только совокупные результаты экспериментальных, клинических исследований и данных фармаконадзора могут позволить полноценно оценить безопасность любого препарата, в том числе с многолетним опытом применения. В связи с этим целью нашей работы стал анализ информации о НР после применения препарата левофлоксацин, поступившей в отечественную базу спонтанных сообщений.

Материал и методы

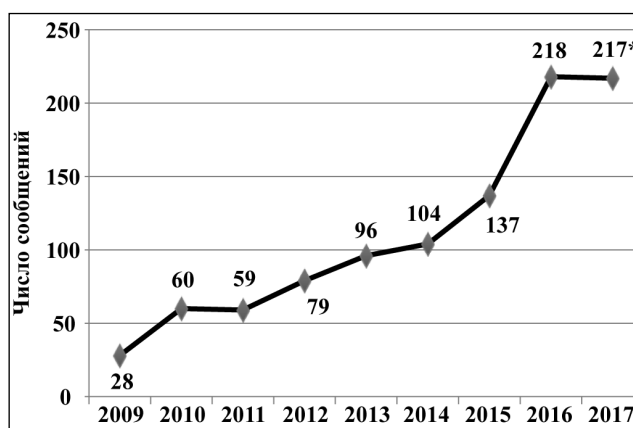
Проведён ретроспективный анализ информации, поступившей в Федеральную базу данных спонтанных сообщений о НР, за период с 1 января 2009 г. по 5 декабря 2017 г. включительно. Критерии включения в анализ:

1. Наличие среди подозреваемых в развитии НР лекарственного препарата левофлоксацин (МНН).
2. Высокая степень достоверности причинно-следственной связи «ЛП–НР» (определенная, вероятная и возможная).

Серьёзность НР определялась в соответствии с критериями, определёнными Федеральным законом от 12 апреля 2010 г. № 61 «Об обращении лекарственных средств». При анализе клинической картины применялась классификация НР в соответствии с поражением органов и систем органов Медицинского словаря для нормативно-правовой деятельности MedDRA®. Из анализа исключены повторные сообщения, сообщения-дубликаты и невалидные сообщения. Для предотвращения конфликта интересов торговые наименования препаратов были зашифрованы.

Результаты исследования

За исследуемый период в базу данных спонтанных сообщений поступило 998 извещений о развитии НР при применении левофлоксацина соответствующих критериям включения. Отмечена положительная динамика репортирования за 9 лет (рисунок), которая, на фоне увеличения эффективности работы по мониторингу безопасности любых ЛС, говорит скорее об общей поло-



Динамика поступления спонтанных сообщений.

Примечание.* — число сообщений за период с 1 января по 5 декабря 2017 г.

жительной динамике направления сведений в российскую базу спонтанной отчётности, чем об изменение показателей безопасности.

Подозреваемые ЛП были представлены 31 торговым наименованием (ТН), из них для препаратов с ТН «Левофлоксацин» отправителями указано 18 производителей. Количество извещений, где не сообщался производитель и ТН, составило 64 СС (6,4%). Практически все подозреваемые препараты представляли собой лекарственные формы для системного действия — 990 СС (99,2%). Информация о левофлоксацине в форме капель глазных содержалась в 8 СС (0,8%).

Были установлены значительные отличия в количестве репортируемой информации на разные ТН препарата. Так, почти половина поступивших сообщений пришлась на препараты двух ТН — ЛФ1 и ЛФ2 (референтный препарат). Извещения о НР при применении левофлоксацина 25 ТН и «Левофлоксацин» 16 производителей составили на каждое ТН ≤ 2,5% сообщений от всех поступивших СС (объединены в группу «Другие») (табл. 1).

Кроме того, установлено, что для 28 препаратов разных производителей поступило от 1 до 5 сообщений на каждый из ЛП, из них для 15 препаратов только по одному сообщению.

Таблица 2. Распределение пациентов по возрастным группам

Препарат	Число СС (% от числа сообщений на препарат)	
	18—64 лет	≥65 лет
ЛФ1	196 (75,7)	57 (22,0)
ЛФ2	145 (71,1)	33 (16,2)
ЛФ3	60 (76,9)	17 (21,8)
ЛФ4	51 (81,0)	9 (14,3)
ЛФ5	27 (79,4)	7 (20,6)
ЛФ6	14 (42,4)	3 (9,1)
ЛФ7	19 (70,4)	7 (25,9)
Другие	179 (75,8)	43 (18,2)
Неизвестные ТН	49 (76,6)	14 (21,9)

Подобный разброс в объёмах репортирования для ЛП разных производителей может быть связан со многими факторами: общая низкая сообщаемость о НР, особенно в первые годы работы системы спонтанной отчётности, разные объёмы потребления препаратов, недостаточное нормативно-правовое регулирование системы фармаконадзора в разные годы. Однако в любом случае, очевидно существование проблемы недорепортирования о НР при применении левофлоксацина.

Сообщения преимущественно содержали информацию о пациентах в возрастной категории 18—64 лет — 74,1% (табл. 2).

При оценке серьёзности НР было установлено, что 237 (23,7%) сообщений содержали подобную информацию (табл. 1). Из них было зарегистрировано 2 (0,2%) случая летальных исходов с высокой СД ПСС. В обоих случаях однозначно связать применение левофлоксацина и развитие летального исхода оказывается затруднительным, в связи с отсутствием необходимых сведений в сообщениях.

Анализ клинической картины НР показал, что наибольший совокупный удельный вес пришёлся на нарушения со стороны кожи и подкожных тканей (32,5% от числа СС), нарушения иммунной системы — реакции гиперчувствительности (30,8%), нарушения органов ЖКТ (29%), общие расстройства и нарушения в месте введения препарата (26,3%). При этом для конкретных препаратов вышеописанные группы НР преобладали в разной степени (табл. 3), с наибольшим удельным весом таких нарушений в СС о применении воспроизведённых препаратов левофлоксацина. Так, нарушения со стороны кожи и подкожных тканей преобладали в СС о НР при применении препарата ЛФ3 (50%), реакции гиперчувствительности — ЛФ5 (82,4%), НР со стороны органов ЖКТ — ЛФ6 (51,5%) и в группе ЛП, где не были указаны ТН и производитель (48,5%), общие расстройства и нарушения в месте введения препаратов составили наибольший удельный вес (39,7%) среди сообщений о НР при применении препарата ЛФ4.

Среди нарушений со стороны кожи и подкожных тканей совокупно преобладали:

— кожный зуд — 130 НР (13% от числа СС);

— кожная сыпь — 97 НР (9,7%);

— гиперемия кожи — 64 (6,4%).

Реакции фотосенсибилизации, характерные для всех фторхинолонов, были указаны в 4 СС (0,4%) при применении трёх ТН препаратов, из них в 2 СС (0,8% от числа сообщений на препарат) в качестве подозреваемого препарата указан ЛФ1, в 1 СС (0,5% от числа сообщений на препарат) — ЛФ2.

Кроме того в 5 сообщениях (0,5%) имелась информация о развитии токсикодермии при применении разных ТН левофлоксацина.

Несмотря на то, что сведения о нарушениях со стороны кожи и подкожных тканей в совокупности преобладали над НР других систем и органов, достоверно меньший вес таких сообщений пришёлся на референтный препарат ЛФ2 и препарат ЛФ6.

Наиболее распространённая в клинических исследованиях левофлоксацина НР — диарея, по данным спонтанных сообщений, среди нарушений со стороны органов ЖКТ заняла второе место. Так, в данной группе НР преобладали:

— тошнота — 78 НР (7,8% от числа СС);

— диарея — 76 НР (7,6%);

— рвота — 45 НР (4,5%).

Гепатотоксические реакции составили 39 НР (3,9%), из них в 15 случаях (1,5%) указывалось повышение уровня печёночных ферментов, и также в 15 случаях (1,5%) — развитие гепатита.

Нарушения со стороны ЦНС, характерные для фторхинолонов, были представлены в 13,2% от всех СС. Из них наибольший удельный вес пришёлся на головокружение — 43 НР (4,3% от числа СС) и головную боль — 28 НР (2,8%). О развитии судорог сообщалось в 17 случаях (1,7%), из них 4 сообщения (1,5% от числа сообщений на препарат) были связаны с применением препарата ЛФ1, 5 (2,5% от числа сообщений на препарат) — ЛФ2. Известно, что судороги на фоне применения фторхинолонов встречаются в основном у пациентов, имеющих факторы риска их развития — эпилепсия, травма головного мозга, метаболические нарушения, гипоксия, сопутствующий приём НПВС. Однако выявить какие-либо провоцирующие факторы в данных 17 случаях нам не удалось, в связи с ограничениями метода спонтанных сообщений.

Таблица 3. Распределение нежелательных реакций по системно-органным классам

Вид нарушения	Число СНР/НР (% НР от числа сообщений на препарат)								
	ЛФ1	ЛФ2	ЛФ3	ЛФ4	ЛФ5	ЛФ6	ЛФ7	Другие	Неизвестные ТН
Поражения кожи и подкожных тканей	10/84 (32,4)	8/39 (19,1)	8/39 (50,0)	2/26 (41,3)	4/10 (29,4)	3/6 (18,2)	3/13 (48,1)	28/91 (38,6)	2/16 (25,0)
	22/80 (30,9)	18/54 (26,5)	9/27 (34,6)	3/20 (31,7)	19/28 (82,4)	2/8 (24,2)	3/6 (22,2)	32/69 (29,2)	6/15 (23,4)
	27/67 (25,9)	7/67 (32,9)	5/28 (35,9)	1/20 (31,7)	0/4 (11,8)	0/17 (51,5)	1/6 (22,2)	14/49 (20,8)	9/31 (48,5)
	25/80 (30,9)	13/51 (25,0)	6/15 (19,2)	2/25 (39,7)	3/5 (14,7)	1/2 (6,1)	0/6 (22,2)	19/63 (26,7)	4/15 (23,4)
Общие расстройства и нарушения в месте введения									
Неврологические нарушения	7/22 (8,5)	16/45 (22,1)	2/8 (10,3)	2/11 (17,5)	0/6 (17,6)	0/2 (6,1)	0/1 (3,7)	4/31 (13,1)	1/6 (9,4)
Нарушения дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения	13/38 (14,7)	6/23 (11,3)	1/2 (2,6)	2/4 (6,3)	1/2 (5,9)	0/1 (3,0)	0/3 (11,1)	17/30 (12,7)	5/11 (17,2)
Сердечно-сосудистые нарушения	8/23 (8,9)	8/22 (10,8)	5/7 (9,0)	3/13 (20,6)	0/2 (5,9)		0/4 (14,8)	3/25 (10,6)	5/8 (12,5)
Нарушения костно-мышечной системы	1/7 (2,7)	1/14 (6,9)	1/3 (3,8)	0/3 (4,8)	0/3 (8,8)	0/3 (9,1)		1/19 (8,1)	2/6 (9,4)
Нарушения психики	0/9 (3,5)	0/11 (5,4)	0/1 (1,3)	0/1 (1,6)	0/1 (2,9)			1/4 (1,7)	1/2 (3,1)
Нарушения лабораторных показателей	1/2 (0,8)	0/2 (1,0)	0/2 (2,6)	0/1 (1,6)				3/14 (5,9)	6/6 (9,4)
Нарушения со стороны органов зрения	1/3 (1,2)	1/2 (1,0)	0/2 (2,6)		0/2 (5,9)	1/1 (3,0)		1/5 (2,1)	0/2 (3,1)
Применение вне инструкции		0/10 (4,9)			0/2 (5,9)				
Другие	4/72 (2,7)	1/67 (32,9)	3/5 (6,4)	0/4 (6,3)	0/1 (2,9)	2/7 (21,2)		2/11 (4,6)	3/4 (6,3)
Всего	119/422 (-)	79/407 (-)	40/139 (-)	15/128 (-)	27/66 (-)	9/47 (-)	7/39 (-)	125/411 (-)	44/123 (-)

В 13 извещениях (1,3% от числа СС) указывалось на расстройства сна или сонливость, в 6 (0,6%) — на возникновении тремора. В двух сообщениях имелась информация о развитии полинейропатии: 1 СС при применении ЛФ1 (0,4% от числа сообщений на препарат), 1 СС при применении ЛФ5 (2,9% от числа сообщений на препарат).

Нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы составили 10,4% от всех СС. Информация о сердечно-сосудистых нарушениях поступала не для всех анализируемых препаратов. Наибольший удельный вес таких НР пришёлся (20,6%) на сообщения о НР при применении препарата ЛФ4, где фигурировали следующие НР: тахикардия (4 СС — 6,3% от числа сообщений на препарат), снижение артериального давления (4 СС — 6,3%), фибрилляция предсердий (2 СС — 3,2%), наджелудочковая экстрасистолия (1 СС — 1,6%), гипертония (1 СС — 1,6%), сердцебиение (1 СС — 1,6%).

В 25 случаях (2,5% от всех СС) было указано об удлинении интервала QT. Так, на препарат ЛФ1 пришлось 7 подобных сообщений (2,7% от числа сообщений на препарат), на препарат ЛФ7 — 3 СС (11,1% от числа сообщений на препарат), на препарат ЛФ3 — 1 СС (1,3% от числа сообщений на препарат), на 4 препарата из группы «Другие» — 9 СС: 1 ЛП — 4 СС (17,4% от числа сообщений на препарат); 1 ЛП — 3 СС (41,3% от числа сообщений на препарат); по одному сообщению ещё на два ЛП. Сведений об удлинении интервала QT при применении референтного препарата ЛФ2 не поступало.

Осложнения со стороны опорно-двигательного аппарата были представлены в 5,8% от всех СС. Распределение данных НР для разных ЛП описано в табл. 4. Так, наибольший удельный вес составила информация о боли в суставе — 22 НР (2,2%). На миалгию и боль в сухожилиях пришлось 10 НР (1,0%) и 7 НР (0,7%), соответственно.

В одном случае сообщалось о пациентке 62 лет, у которой спустя 10 дней после окончания терапии препаратом ЛФ1 (показание: «острый бронхит») в суточной дозе 500 мг *per os* на фоне применения метилпреднизолона (показание: «полимиозит, склеродермия») произошёл разрыв Ахиллова сухожилия.

Поражения опорно-двигательного аппарата относят к известным осложнениям терапии фторхинолонами. Так, у взрослых пациентов атралгия развивается в 1% случаев, хотя точная распространённость её до сих пор не известна [2]. Мышечная боль, как правило, возникает на первой неделе лечения и может сочетаться с мышечной слабостью. Развитие тендинопатии описано при лечении всеми препаратами фторхинолонов для системного применения, а около половины пациентов с разрывом сухожилий имели в анам-

Таблица 4. Нежелательных реакций со стороны опорно-двигательного аппарата

НР	Число СС (% от числа сообщений на препарат)							Неизвестные ТН
	ЛФ1	ЛФ2	ЛФ3	ЛФ4	ЛФ5	ЛФ6	Другие	
Боль в суставе	4 (1,5)	1 (0,5)	2 (2,6)				12 (5,1)	3 (4,7)
Миалгия		3 (1,5)		2 (3,2)	2 (5,9)	2 (6,1)	1 (0,4)	
Боль в сухожилиях		5 (2,5)					1 (0,4)	1 (1,6)
Нарушение движений	2 (0,8)		1 (1,3)				2 (0,8)	
Тендинит						1 (3,0)		1 (1,6)
Артрит							1 (0,4)	1 (1,6)
Разрыв Ахиллова сухожилия	1 (0,4)							

незе приём кортикостероидов [4, 5], что также согласуется с результатами нашего исследования.

Также для ряда препаратов были зарегистрированы НР со стороны психики, среди которых отмечались депрессия, галлюцинации, психоз, нарушения восприятия, апатия, тревога и неуточнённые нарушения психики. Совокупный вес таких НР составил 2,9% (29 НР), при этом наибольшее их число пришлось на препараты ЛФ1 (2,7% от числа сообщений на препарат) и ЛФ2 (4,4% от числа сообщений на препарат). Значительным оказался удельный вес сообщений о развитии депрессии на фоне применения препарата ЛФ2 — 6 НР (2,9%).

При этом важно отметить, что высокий уровень направляемых сведений на ЛП, во многом характеризует систему фармаконадзора компании-производителя этого ЛП. Так, в ходе нашего исследования было установлено, что извещения о НР при применении ЛФ2, пришедшие от держателя регистрационного удостоверения, составили 53,9%, что говорит об активном участии производителя в мониторинге безопасности своего препарата. В тоже время, несмотря на высокое число извещений, направляемых сведений о НР при применении ЛФ1 оказались только представители ЛПУ, а данных от держателя регистрационного удостоверения не поступало, что ставит вопрос о выполнении ими требований к осуществлению фармаконадзора.

Можно констатировать, что, несмотря на ограничения метода спонтанных сообщений, в российскую базу данных НР поступает значительный объём сведений касающихся безопасности левофлоксацина, позволяющий при необходимости вырабатывать своевременные административные меры, направленные на повышение эффективности и безопасности препарата. Отмечается склонность многих отправителей сообщать только о серьёзных и тяжёлых НР, информация о которых подлежит срочному репортированию. Всё это в первую очередь говорит о больших масштабах потребления препарата, которые позволяют выявлять многие очень редкие НР. Вместе с тем, на этапе принятия решения о направлении тех или иных сведений в регуляторный орган необходимо учитывать, что увеличение частоты несерьёзных НР для конкретного препарата также может являться сигналом о безопасности.

Очевидно, что только совокупная эквивалентность фармацевтических, фармакокинетических и фармакодинамических свойств воспроизведённого ЛП оригинальному может быть основанием для признания ЛП взаимозаменяемым и гарантировать сохранение надлежащего качества, безопасности и эффективности. В противном случае, такие преимущества генериков, как меньшие материальные затраты на оказание лекарственной помощи нивелируются, или происходит рост затрат при использовании неэквивалентных воспроизведённых препаратов [6—8].

Вместе с тем, в исследовании, посвящённом изучению сопоставимости показателей теста растворимости оригинального левофлоксацина и его генерических аналогов для прогнозирования сходства их клинических свойств, было установлено, что оригинальный левофлоксацин обладает стабильными параметрами биодоступности, которые существенно не меняются при различных условиях pH среды. В то же время параметры биодоступности воспроизведённых препаратов левофлоксацина значимо зависели от кислотности среды высвобождения, что привело к снижению биодоступности со 100%, заявленных в инструкции по применению до 73% — по результатам исследования [9]. Закономерно, что следствием низкой биодоступности воспроизведённого препарата окажется создание субтерапевтических концентраций в организме, и, в свою очередь, приведёт к неэффективности ЛП, а также к риску селекции резистентных штаммов микроорганизмов.

Недавняя работа по изучению возможности использования данных метода спонтанных сообщений как инструмента контроля взаимозаменяемых лекарственных препаратов в условиях их широкого применения, показала значительное преобладание сведений в федеральной базе данных спонтанных сообщений о развитии НР при замене референтного ЛП на воспроизведённый в сравнении с другими вариантами замен. Несмотря на то, что в данном исследовании прицельного анализа случаев НР, связанных с заменами левофлоксацина не проводилось, на этапе скрининга было выявлено сообщение, о неэффективности воспроизведённого левофлоксацина, потребовавшее его замены на оригинальный препарат. Так, пациент 50 лет в течение 7 дней принимал генерик левофлоксацина по по-

казанию «Обострение хронического простатита» без динамики, на 7-й день терапии была проведена замена на оригинальный препарат с последующей положительной динамикой на вторые сутки [10].

Важно подчеркнуть, что современное законодательство в области фармаконадзора предполагает обязательное репортирование о случаях индивидуальной непереносимости, отсутствии эффективности ЛП и о выявленных случаях побочных действий ЛП, которые стали основанием для выписки ЛП по торговому наименованию [11]. При этом подобные случаи требуют срочного оповещения в срок, не превышающий пяти рабочих дней с даты выписки соответствующего ЛП по торговому наименованию.

Очевидно, что проблема взаимозаменяемости антимикробных препаратов сохраняет свою остроту, несмотря на убеждение в том, что доказательство биоэквивалентности позволяет говорить о равенстве в эффективности и безопасности препаратов. В связи с этим необходимо помнить, что высокий уровень направляемых сведений в регуляторный орган и как можно более полная информация по каждому случаю НР, в особенности касающихся замен в рамках одного МНН, несомненно, даёт возможность контролировать эффективность и безопасность препаратов в условиях реальной клинической практики и, в том числе, тех ЛП, которые уже признаны взаимозаменяемыми. Только выполнение установленных требований на всех этапах обра-

щения лекарственных средств позволит повысить эффективность и безопасность лечения пациентов.

Закключение

Установлены значительные отличия в количестве репортируемой информации о НР при применении левофлоксацина разных производителей. Четверть поступивших сообщений содержала информацию о серьёзных НР. Наибольший совокупный удельный вес составили нарушения со стороны кожи и подкожных тканей (32,5%), реакции гиперчувствительности (30,8%), нарушения органов ЖКТ (29%), общие расстройства и нарушения в месте введения препарата (26,3%). Несмотря на недорепортирование о НР при применении данного препарата, объём поступающих сведений, касающихся безопасности левофлоксацина, позволяет, в случае необходимости, вырабатывать своевременные административные решения.

Таким образом, имеющиеся данные системы фармаконадзора могут свидетельствовать о разном профиле безопасности лекарственных препаратов даже в рамках одного международного непатентованного наименования.

Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

The publication has been prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100».

ЛИТЕРАТУРА

1. Ушкалова Е.А., Зырянов С.К. Ограничения на применение фторхинолонов при неосложнённых инфекциях и проблемы безопасности. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2017. — Т. 19. — № 3. — С. 208—213. / Ushkalova E.A., Zyryanov S.K. Ogranicheniya na primeneniye florkhinolonov pri neoslozhnennykh infektsiyakh i problemy bezopasnosti. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2017; 19: 3: 208—213. [in Russian]
2. Ушкалова Е.А., Зырянов С.К. Левофлоксацин: соотношение «польза-риск». Фарматека. — 2017. — № S2. — С. 36—42. / Ushkalova E.A., Zyryanov S.K. Levofloxacin: sootnoshenie «pol'za-risk». Farmateka 2017; S2: 36—42. [in Russian]
3. IMS Health National Sales Perspective (NSP), Y2014. Source File: NSP_2015-896 FQ AC 2014.
4. Khaliq Y., Zhanel G.G. Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. Clin Infect Dis 2003; 36: 1404—1410.
5. Stephenson A.L., Wu W., Cortes D., Rochon P.A. Tendon Injury and Fluoroquinolone Use: A Systematic Review. Drug Saf 2013 Sep; 36 (9): 709—721.
6. Зырянов С.К., Белоусов Ю.Б. Дженирики антибактериальных препаратов: за и против. Справочник поликлинического врача. — 2012. — № 5. — С. 11—13. / Zyryanov S.K., Belousov YU.B. Dzheneriki antibakterial'nykh preparatov: za i protiv. Spravochnik poliklinicheskogo vracha 2012; 5: 11—13. [in Russian]
7. Никулин А.А., Цюман Ю.П., Мартинович А.А., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С. К вопросу о взаимозаменяемости внутривенных форм оригинальных и генерических препаратов: нужны ли сравнительные исследования? Клин микробиол антимикроб химиотер. — 2010. — Т. 12. — № 1. — С. 31—40. / Nikulin A.A., Tsyuman Yu.P., Martinovich A.A., Ehjdel'shtejn M.V., Kozlov R.S. K voprosu o vzaimozamenyaemosti vnutrivennykh form original'nykh i genericheskikh preparatov: nuzhny li sravnitel'nye issledovaniya? Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2010; 12 (1): 31—40. [in Russian]
8. Смоленов И.В., Красильникова А.В. Фармакоэкономические аспекты применения азитромицина различных производителей при внебольничной пневмонии взрослых. Фарматека. — 2003. — № 13. — С. 78—87. / Smolenov I.V., Krasil'nikova A.V. Farmakoekonomicheskie aspekty primeneniya azitromitsina razlichnykh proizvoitatelej pri vnebol'nichnoj pnevmonii vzroslykh. Farmateka 2003; 13: 78—87. [in Russian]
9. Зырянов С.К., Белоусов Ю.Б., Камаев А.В., Лелишенцев А.А., Зверков Ю.Б. Эффективность применения левофлоксацина — слагаемые успеха. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2012. — Т. 14. — № 1. — С. 34—37. / Zyryanov S.K., Belousov YU.B., Kamaev A.V., Lelishentsev A.A., Zverkov YU.B. Ehffektivnost' primeneniya levofloksatsina — slagaemye uspekha. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2012; 14: 1: 34—37. [in Russian]
10. Пастернак Е.Ю., Затолочина К.Э., Аляутдин Р.Н., Олефир Ю.В., Романов Б.К. и др. Метод спонтанных сообщений как инструмент контроля взаимозаменяемых лекарственных препаратов в условиях их широкого применения. Врач. — 2016. — №9. — С.2—5. / Pasternak E.YU., Zatolochina K.EH., Alyautdin R.N., Olefir Yu.V., Romanov B.K. i dr. Metod spontannykh soobshchenij kak instrument kontrolya vzaimozamenyaemykh lekarstvennykh preparatov v usloviyakh ikh shirokogo primeneniya. Vrach 2016; 9: 2—5. [in Russian]
11. Приказ Росздравнадзора от 15.02.2017 № 1071 «Об утверждении Порядка осуществления фармаконадзора». / Prikaz Roszdravnadzora ot 15.02.2017 № 1071 «Ob utverzhdenii Poryadka osushchestvleniya farmakonadzora» [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зырянов Сергей Кенсаринович (Zyryanov S.K.) — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии Российского университета дружбы народов, Москва; заместитель главного врача по терапии ГКБ №24 ДЗ г. Москвы

Затолочина Карина Эдуардовна (Zatolochina K.E.) — к. м. н., ассистент кафедры общей и клинической фармаколо-

гии Российского университета дружбы народов, Москва

Асецкая Ирина Львовна (Asetskaya I. L.) — к. м. н., доцент, доцент кафедры общей и клинической фармакологии Российского университета дружбы народов, Москва; ведущий специалист Центра мониторинга эффективного, безопасного и рационального использования лекарственных средств ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора.

Дезоксирибонуклеиновая кислота про- и эукариот в профилактике и терапии инфекционных болезней

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, И. Д. МАКАРЕНКОВА¹, Л. Н. ФЕДЯНИНА², Ж. И. АВДЕЕВА³,
С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ⁴, Т. А. КУЗНЕЦОВА^{1,2}, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток

² Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины, Владивосток

³ Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва

⁴ Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, Владивосток

Prokaryotic and Eukaryotic DNA in Prevention and Treatment of Infectious Diseases

N. N. BESEDNOVA¹, I. D. MAKARENKOVA¹, L. N. FEDYANINA², ZH. I. AVDEEVA³,
S. P. KRYZSHANOVSKY⁴, T. A. KUZNETSOVA^{1,2}, T. S. ZAPOROZHETS¹

¹ G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² Far Eastern Federal University, School of Biomedicine, Vladivostok

³ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

⁴ Vladivostok State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok

В обзоре представлены материалы последних лет, посвящённые анализу современных представлений о возможных аспектах использования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и олигодезоксинуклеотиды (природных и синтетических) из про- и эукариот для профилактики и лечения инфекционных болезней. Авторы акцентируют внимание на бактериальной ДНК с высоким содержанием CpG-мотивов, а также на неметилированные CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG-ODN), стимулирующие систему врождённого и адаптивного иммунитета. В связи с отсутствием выраженной токсичности и хорошей переносимостью макроорганизмом эти соединения представляют большой интерес для медицинского применения, в частности в качестве адъювантов. В то же время авторы отмечают необходимость разработки эффективных систем доставки CpG-ODN в ткани и клетки-мишени. В отношении CpG-мотивов ДНК эукариот рассматривается возможность их использования в качестве основы эффективных адъювантов, иммуномодуляторов, противовирусных и противобактериальных соединений.

Ключевые слова: дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG-ODN), адъюванты, инфекционные болезни, врождённый и приобретённый иммунитет.

The review article presents the materials of recent years dedicated to the analysis of modern data about the possible aspects of the use of deoxyribonucleic acid (DNA) and oligodesoxynucleotides (natural and synthetic) from pro — and eukaryotes for the prevention and treatment of infectious diseases. The authors focus on bacterial DNA with a high content of CpG motifs, as well as on unmethylated CpG oligonucleotides (CpG-ODN), which stimulate the system of innate and adaptive immunity. Due to the absence of pronounced toxicity and good tolerance of the macroorganism, these compounds are of great interest for medical use, in particular as adjuvants. At the same time, the authors note the need to develop effective CpG-ODN delivery systems in tissues and target cells. With respect to CpG-motives of eukaryotic DNA, the possibility of their use as a basis for effective adjuvants, immunomodulators, antiviral and antibacterial compounds is considered.

Keywords: deoxyribonucleic acid (DNA), CpG-oligonucleotide (CpG-ODN), adjuvants, infectious disease, innate and adaptive immunity.

Введение

Создание вакцин нового поколения основано на современных представлениях о физиологии бактерий и вирусов, использовании достижений молекулярной биологии, геномики, протеомики, прикладной и фундаментальной иммунологии. Неотъемлемой частью конструирования совре-

менных вакцин для защиты от инфекционных заболеваний различного генеза, в том числе особо опасных инфекций, являются новые геномные технологии. Однако новые вакцинные препараты в ряде случаев обладают недостаточной иммуногенностью из-за отсутствия в их составе патоген-ассоциированных молекулярных структур микроорганизмов, взаимодействующих с рецепторами клеток-эффекторов врождённого иммунитета [1, 2]. Такие вакцины требуют включения в свой состав современных природных или синтетических

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 690087 Владивосток, ул. Сельская,
1. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова

адъювантов (от латинского глагола «*adjuvare*» — помогать, усиливать), повышающих иммунный потенциал вакцин.

Адъювант — это субстанция или комбинация субстанций, которые входят в вакцину или вводятся одновременно с ней для усиления иммунного ответа на бактериальные и вирусные антигены вакцин, анатоксины, рекомбинантные и синтетические антигены, а также для детерминации направленности эффекторных реакций иммунокомпетентных клеток и индукции долговременной иммунологической памяти [3–5].

Присутствие адъюванта способствует возможности снижения антигенной нагрузки за счёт уменьшения дозы вакцины и кратности вакцинации, необходимых для успешной иммунизации и оптимизации иммунизации лиц с низкой реактогенностью, в том числе, пожилых людей. Указанный компонент вакцины помогает ориентировать антиген на взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками, включая дендритные клетки, и в зависимости от химической природы защищает его от деградации. Адъювант должен эффективно обеспечивать относительно низкую скорость высвобождения и адсорбции антигена при минимуме токсических, аллергенных, раздражающих и других нежелательных эффектов в отношении хозяина, быть иммунологически инертным, способствовать выработке цитотоксических Т-лимфоцитов против конкретного возбудителя, пролонгировать гуморальный иммунный ответ на минимальное количество антигена, обеспечивая высокий уровень иммунной защиты.

По мнению ряда авторов, адъювант должен иметь стабильную структуру, быстрое воспроизводство и низкую себестоимость [6–8]. Применение адъювантов позволяет использовать для вакцинации меньшую дозу антигена, что может оказаться необходимым, например, в условиях пандемии при недостаточности производственных мощностей для производства вакцины [9].

В течение нескольких десятилетий практически единственным разрешённым к применению адъювантом были соли алюминия, которые используются при промышленном производстве большинства вакцин во всем мире [2, 10]. Механизм действия соединений алюминия заключается в адсорбции антигена за счёт ионного взаимодействия и создания депо антигенов, хотя последнее положение в настоящее время подвергается сомнению, так как установлено, что только депонирование антигена не обеспечивает существенного усиления иммунного ответа. В числе недостатков соединений алюминия — относительно краткий период индукции образования антител, в связи с чем требуется повторная вакцинация, а также отсутст-

вие его действия на клеточный иммунный ответ. Кроме того, адъюванты на основе соединений алюминия способствуют развитию различных побочных эффектов, включая местные и системные реакции, риск развития болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных расстройств [11].

Существует множество гипотез о механизмах действия соединений алюминия, основанных на многочисленных *in vitro* и немногих *in vivo* экспериментах. Детальное обсуждение механизмов действия адъювантов на основе соединений алюминия приводится в обзоре Т. R. Ghimire [10].

Таким образом, поиск и внедрение новых безопасных адъювантов, действующих непосредственно на иммунокомпетентные клетки и стимулирующих формирование выраженного адаптивного иммунного ответа, является важнейшим направлением современной вакцинологии.

Несмотря на значительное число разработок и широкий диапазон применяемых адъювантов в экспериментальных исследованиях, получение новых неспецифических стимуляторов иммунного процесса остаётся весьма актуальной проблемой. Обращает на себя внимание тот факт, что в последние 150 лет всего несколько адъювантов дошли до стадии клинических испытаний [12–15].

Значительной адъювантной активностью обладает бактериальная ДНК с высоким содержанием CpG (CpG — сокращение для цитозина и гуанина, разделённых фосфатом, связывающим эти два нуклеотида вместе с ДНК) мотивов [16]. Бактериальная ДНК, не имеющая выраженной токсичности, признана мощным иммуноадъювантом Th1-типа, превосходя по этому показателю полный адъювант Фрейнда, который не нашёл клинического применения [17–19].

Меньше литературных данных об адъювантных свойствах ДНК эукариотов [20–24], поскольку долгое время считалось, что она иммунологически инертна.

Нуклеиновые кислоты и их фрагменты — олигонуклеотиды (короткие фрагменты ДНК или РНК, получаемые либо путём химического синтеза, либо расщеплением более длинных полинуклеотидов), оказывают ряд универсальных эффектов при попадании в организм. Так, они восстанавливают функции барьерных органов (печени, селезёнки, кишечника), костного мозга, а также модулируют функции иммунной системы: увеличивают количество лимфоцитов, CD4⁺-, CD8⁺Т-клеток; стимулируют фагоцитоз, восстанавливают бактерицидную активность лейкоцитов; усиливают антителообразование, подавляют хроническое воспаление через взаимодействие и активацию TLR9 [25]. Дезоксинуклеотиды участвуют в регуляции обмена веществ,

а также уменьшают тяжесть течения аутоиммунных заболеваний.

Среди многообразия синтетических CpG-олигонуклеотидов (CpG-ODN) отдельные представители, в частности, CpG-7909 и CpG-1018, входят в состав допущенных для клинических испытаний экспериментальных вакцин против заболеваний бактериальной и вирусной природы, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Адъювант CpG-7909 (другие названия — CpG-2006, VaxImmune™) был использован при проведении 35 клинических исследований разрабатываемых вакцин против различных злокачественных новообразований, инфекционных болезней и инфекционных агентов биотерроризма. К настоящему времени адъювант VaxImmune™, производимый Coley Pharmaceutical Group (с 2015 г. — Merck&Co), позиционируется как перспективный продукт для использования в вакцинных программах.

Очень важным преимуществом CpG-ODN как адъюванта является отсутствие выраженной токсичности и хорошая переносимость [18, 19].

Настоящее сообщение посвящено анализу современных представлений о возможных аспектах использования олигонуклеотидов (природных и синтетических) из про- и эукариот для профилактики и лечения инфекционных болезней.

ДНК и иммунная система

Нуклеиновые кислоты — один из важнейших компонентов иммунного гомеостаза организма, обладающий широким спектром иммуотропных и общебиологических эффектов [16, 21]. ДНК про- и эукариот стимулирует врожденный иммунитет и создает защиту от инфекционных агентов у позвоночных животных. Свойства бактериальной ДНК (бДНК) как иммуномодулятора определяются последовательностью нуклеотидов [22, 26].

Олигонуклеотиды, не имеющие в своём составе CpG динуклеотидов, не обладают иммуногенной активностью [27]. При принципиальном сходстве бДНК по строению и структуре, она существенно отличается от ДНК позвоночных животных и человека. ДНК позвоночных содержит небольшое количество потенциальных иммуностимулирующих CpG мотивов по сравнению с бДНК, а также различается по характеру метилирования динуклеотидов. Как показали многочисленные исследования, именно неметилированные CpG динуклеотиды обладают иммуностимулирующей активностью и активируют В- и NK клетки [28]. У позвоночных животных метилировано 70—80% CpG сайтов. Бактериальная ДНК в CpG сайтах метилированию не подвергается [29]. Доказательство иммуностимулирующей

роли бДНК и неметилированных CpG динуклеотидов позволило синтезировать ряд их аналогов для иммунотерапии инфекционных и онкологических заболеваний [27, 28, 30].

Бактериальная ДНК при попадании в организм воспринимается иммунной системой как патогенный агент, способный вызвать инфекционный процесс, в результате чего очень быстро активируются различные неспецифические механизмы иммунологической защиты. При этом CpG-ODN непосредственно или в качестве ко-стимулирующего агента активируют практически все клетки иммунной системы.

CpG-ДНК и CpG-ODN являются агонистами TLR9, связывающими неметилированные CpG мотивы бДНК и ДНК позвоночных, а также синтетические CpG-ODN [31, 32], которые поглощаются клетками иммунной системы, способствуя индукции врожденных и адаптивных иммунных реакций. Для образования стехиометрического димера необходим процессинг рецептора. Если он отсутствует или нарушен, образуются практически только мономерные формы. U. Otho et al. [33] назвали механизм связывания CpG-мотива с сайтом рецептора «молекулярным клеем». Для проявления активности необходим определенный «шаблон» мотива — RRCGY (С-цитозин, G-гуанин, R, Y — пуриновые и пиримидиновые основания). Связывание CpG-ДНК с TLR9 индуцирует протеолитическое расщепление рецептора [34].

TLR-опосредованная активация иммунокомпетентных клеток происходит через сигнальный каскад, вовлекающий MyD88 и сигнальные молекулы IL-1, IRAK и TRAF-6 и завершающийся активацией экспрессии генов, опосредующих воспалительный ответ [18]. Кульминацией в этом сигнальном каскаде является активация нескольких транскрипционных факторов, включая NF-κB, AP-1 и IRF-7 [2, 18, 35].

CpG-ДНК является мощным активирующим сигналом для дендритных клеток животных и человека и вызывает высокий уровень продукции цитокинов, ассоциированных с Th1 (IL-12, IL-18). Кроме того, CpG-ДНК ускоряет созревание дендритных клеток, определяемое экспрессией CD83, костимуляторных молекул ICAM-1, а также CD40 и молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, что способствует активации Т-лимфоцитов [36].

Синтетические CpG-мотивы представлены 4 классами — А, В, С и Р [27]. К А классу (другое название — Д-тип) относят фосфодиэстеразные CpG-ODN, неустойчивые к действию эндонуклеаз. Они являются мощными индукторами IFNα и активаторами NK клеток, но их способность активировать В-лимфоциты невелика. В-класс CpG-ODN (или К-тип) — модифициро-

ванные фосфоротионатные нуклеотидные последовательности, проявляют длительную стимулирующую активность по типу лимфаденопатии. ODN этого типа устойчивы к действию нуклеаз, активируют В-лимфоциты и стимулируют секрецию $\text{TNF}\alpha$ и IL-12 . Под действием CpG-ODN В-класса наблюдается ускорение созревания плазматоидных дендритных клеток и моноцитов, а также слабая активация NK-клеток. CpG-ODN С-класса характеризуются модифицированными фосфоротионатными нуклеопротеидными последовательностями и сочетают в себе иммуностимулирующие свойства CpG-ODN А и В классов, хотя выражены они значительно слабее. CpG-ODN Р-класса — мощные индукторы $\text{IFN-}\gamma$, но слабо стимулируют активацию В-клеток и плазматоидные дендритные клетки.

Наибольшую иммуноадъювантную активность проявляют синтетические CpG-ODN В и С классов, их чаще всего включают в состав экспериментальных вакцин. Они осуществляют перекрестное взаимодействие между TLR9 и В-клеточными рецепторами, приводящее к стимуляции антигенспецифических В-клеток, повышают выживаемость В-клеток, усиливают общую иммуногенность вакцин. CpG-ДНК активируют секрецию цитокинов Th1-типа и хемокинов, оказывают антиапоптотический эффект на CD4 и CD8 Т-клетки. Очень важен уровень содержания CpG-мотивов, находящихся в ДНК микроорганизма. Чем больше их в нуклеотидной цепи, тем большее количество рецепторов на клетках будет его связывать. Активность CpG-ODN зависит от их первичной структуры. ODN, содержащие TTAGGG-мотивы, проявляют иммуносупрессивную активность и подавляют продукцию провоспалительных цитокинов [37]. Такие «супрессивные» ODN могут быть использованы для подавления иммунопатологических реакций, например, при аутоиммунных процессах [38].

Нарушения в работе иммунной системы (как активация, так и супрессия) занимают одно из ведущих мест в патогенезе инфекционных заболеваний, а знание глубоких механизмов воздействия различных биологически активных веществ на клетки организма позволит регулировать их функциональную активность. Выявление особенностей и механизмов действия CpG-мотивов может иметь большое значение для создания препаратов, направленных на определённые молекулярные мишени, которые можно будет как активировать, так и ингибировать.

Если кратко суммировать эффекты бактериальной ДНК, природных и синтетических CpG-ODN, можно заключить, что указанные соединения участвуют в активации двух этапов иммунного ответа — антигеннезависимого, проявляющегося в активации факторов врождённого иммунитета, и

антигензависимого, на котором происходит формирование специфического иммунного ответа.

К настоящему времени доказана способность низкомолекулярной ДНК (нДНК), полученной из молок осетровых и лососевых рыб, стимулировать врождённый и адаптивный иммунитет [22, 24, 39]. Нуклеопротеиды лососевых рыб обладают значительным фармакологическим потенциалом, так как их белок (протамин), в отличие от белков (гистонов) других рыб и беспозвоночных, образуют с ДНК более сильный биологический комплекс. Доказана способность нДНК из молок лососевых рыб повышать функциональную активность фагоцитов, индуцировать выработку цитокинов с избирательным регуляторным эффектом по отношению к разным гемопоэтическим цитокинам (IL-3 и GM-CSF), а также цитокинам, вырабатываемым преимущественно Th1-клетками ($\text{IFN}\gamma$), т.е. способствует, как и бДНК, развитию клеточного иммунного ответа [22, 23].

Широкое распространение получили лекарственные препараты деринат и ферровир, основой для которых являются молоки осетровых и лососевых рыб. Деринат содержит короткие и средние цепи ДНК, оканчивающиеся CpG-мотивом. В работе О. Ю. Филатова и соавт. [40] показана способность иммунокомпетентных клеток изменять экспрессию TLR9 под действием дерината. При этом в макрофагах происходит четко фиксируемое дозозависимое повышение экспрессии TLR9. Препарат является олигодезоксинуклеотидом (ODN) с м.м. до 500 кДа., зарегистрирован в двух фармакологических группах — как иммуномодулятор и как репаратант. Ферровир — очищенная и стандартизованная комплексная соль дезоксинуклеата натрия с железом, обладающая противовирусной и иммуномодулирующей активностью.

ДНК из молок лососевых рыб используется также как составная часть биологически активных добавок к пище (БАД). Например, на Дальнем Востоке широко используется БАД к пище «ДНК-С» из молок лососевых рыб. Биологические свойства этой БАД достаточно хорошо исследованы дальневосточными учёными. Показано иммуностропное, противовоспалительное антиинфекционное, антиоксидантное, радиозащитное действия этого биопрепарата [22, 23, 41, 42].

ДНК и CpG-ODN в профилактике и лечении инфекционных болезней

Использование нативной ДНК про- и эукариот, а также природных и синтетических олигодезоксинуклеотидов (CpG-ДНК и CpG-ODN) является перспективным подходом к разработке методов профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций. Такие соединения могут применяться как лечебные средства и для

профилактики инфекционных болезней, самостоятельно или в качестве адъювантов современных вакцин.

Поскольку CpG-ODN отличаются отсутствием выраженной токсичности и высокой иммуностимулирующей активностью, использование их в составе вакцин одобрено глобальным консультативным комитетом по безопасности вакцин (ГККБВ) ВОЗ [43].

Герпесвирусная инфекция

Попытки использовать CpG-ODN при создании антигерпетических лечебных и профилактических препаратов предпринимались ранее и предпринимаются до настоящего времени в связи с чрезвычайной актуальностью этой проблемы, поскольку более 417 млн человек на земном шаре заражены вирусом герпеса [44]. У 50% из них ежегодно наблюдаются рецидивы болезни, т. е. при герпесе, как и при других хронических заболеваниях, связанных с персистенцией вируса, развиваются иммунодефицитные состояния, обусловленные недостаточностью различных звеньев иммунной системы и её неспособностью элиминировать вирус из организма [45].

CpG-ODN в качестве средства монотерапии. В литературе достаточно много работ, в которых представлены результаты экспериментов, свидетельствующих о противовирусной и иммуномодулирующей активности CpG-ODN при генитальном герпесе. Так, интравагинальное введение мышам CpG-ODN за 24 ч до заражения их смертельной дозой вируса HSV-2 (интравагинально) защищало животных от гибели. В вагинальных смывах животных, получивших CpG-ODN, вирус практически не обнаруживался, а патологические изменения слизистой были минимальными. В слизистой влагалища отмечалось увеличение числа дендритных клеток, наблюдалась ускоренная пролиферация и утолщение влагалищного эпителия [46].

Аналогичные результаты получены и при введении препарата через 4 ч после заражения. В случае начала лечения через 24 или 72 ч, терапия была неэффективной. Местное применение CpG-ODN не препятствовало проникновению вируса в клетки слизистой оболочки, но значительно ингибировало репликацию вирусных частиц. У мышей, пролеченных CpG-ODN, также наблюдался защитный эффект по отношению к реинфекции, что свидетельствует о стимуляции не только врожденного, но и адаптивного иммунитета к вирусу герпеса. Эти исследования показали, что CpG-ODN в качестве средства монотерапии обеспечивает защитный иммунитет против герпесвирусной инфекции [47].

Близкие результаты (значительное снижение титра вируса в вагинальных смывах мышей C57Bl/6, 80% выживаемость животных) были по-

лучены А.М. Harandi et al. [48], которые связывают этот эффект с быстрым началом продукции $IFN\gamma$, IL-12, IL-18 и хемокина RANTES клетками слизистой половых путей животных под действием CpG-ODN. Авторы считают, что местное вагинальное введение CpG-ODN может служить перспективной потенциальной стратегией профилактики генитальной вирусной инфекции. Что касается роли $IFN\gamma$ в защите организма от вирусных инфекций вообще и герпесвирусных инфекций, в частности, то авторы установили, что $IFN\gamma$ способен напрямую ингибировать репликацию HSV-2, блокируя активацию транскрипции так называемых немедленных ранних генов [49]. Кроме того, $IFN\gamma$ усиливает экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов на клетках-мишенях, способствуя распознаванию и последующему уничтожению инфицированных клеток Т-лимфоцитами, индуцирует пролиферацию, активирует функции НК-клеток, а также регулирует экспрессию молекул адгезии (ICAM-1) на клетках эндотелия, направляя иммунокомпетентные клетки в ткань-мишень, что оказывает влияние на распространение вируса HSV-2 в организме [50].

Таким образом, ДНК про- и эукариот, а также CpG-ДНК и CpG-ODN обладают выраженным противовирусным и иммуномодулирующим действием.

В качестве иммуномодулятора при герпесвирусной инфекции у людей используют деринат, который оказывает влияние на гуморальный и клеточный иммунитет [51]. Установлено, что препарат стимулирует В и Т-лимфоциты, клетки моноцитарно-макрофагального ряда, НК-клетки, ускоряя элиминацию патогена, а также оказывает мощное репаративное действие на поврежденные ткани [22, 23, 52, 53].

Эффективным и безопасным средством терапии и профилактики пациентов с рецидивирующим герпесом является лекарственный препарат ферровир, использующийся как в комплексной, так и в монотерапии острых и хронических инфекционных заболеваний, вызываемых различными РНК- и ДНК-содержащими вирусами [40, 54]. Показано, что стимулированные ферровиром через TLR9 плазмоцитоидные дендритные клетки способны влиять на дифференцировку Th0 в Th2 (наивных Т-хелперов в Т-хелперы 2-го типа). Под влиянием Th2 происходит дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки, секретирующие IgG2, IgG4 [55].

Н. Н. Минаевым и соавт. [56] отмечена четкая взаимосвязь между применением для лечения пациенток с рецидивирующим генитальным герпесом ферровира, содержащего агонист TLR, и повышенным содержанием в плазме крови высокоаффинных типоспецифических антител к вирусу

простого герпеса. Кроме того применение ферровира способствовало длительному периоду клинической ремиссии (от 6 до 12 мес.).

СрG-ODN в качестве адъювантов вакцин против герпеса. Создание эффективной профилактической и терапевтической вакцины против генитального герпеса до сих пор остаётся актуальной задачей [57]. Большинство инфекционных агентов проникает в организм через слизистые оболочки. Оральные, назальные, лёгочные и урогенитальные мукозные поверхности являются входными воротами для возбудителей. В настоящее время большинство вакцин вводят парентерально или иным инвазивным методом. Такой способ введения запускает системный иммунный ответ, но не может обеспечить адекватную местную иммунную защиту. Эффективные мукозальные вакцины способны не только создавать местную защиту, но и стимулировать системный иммунный ответ. Однако в отношении создания противогерпесных мукозальных вакцин вопрос пока не решён. Для конструирования мукозальной вакцины необходимы адъюванты, способные стимулировать клеточно-опосредованный иммунный ответ на слизистых.

СрG-ODN относятся к иммуностимулирующим адъювантам, которые повышают проницаемость слизистой для антигенов, способствуют активации провоспалительных факторов на первых этапах иммуногенеза. Кроме того, мукозальная вакцина должна достигать клеток-мишеней для индукции иммунного ответа. Эффективная терапевтическая вакцина против вируса простого герпеса должна индуцировать иммунный ответ Th1 типа и подавлять продукцию некоторых противовоспалительных цитокинов, в частности, IL-10 [57].

Синтетические ODN были использованы в качестве адъюванта мукозальной вакцины при интраназальной вакцинации мышей рекомбинантным гликопротеином В вируса герпеса против экспериментальной герпесвирусной инфекции, вызванной HSV-1 [58], что приводило к значительному повышению уровня IgG и IgA в сыворотках крови и вагинальных смывах животных, а также к выраженному снижению уровня репликации вируса. Как свидетельствуют исследования S. D. Holmberg et al. [59] и E. W. Hook et al. [60], заболевания половых путей, связанные с вирусом HSV-2, являются фактором риска для развития вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Положительные результаты экспериментов открывают перспективы разработки эффективных лекарственных препаратов для защиты организма от возбудителей инфекций, передаваемых половым путём, в том числе и от ВИЧ.

Применение вакцины HSV-1 в сочетании с СрG-ODN в виде глазных капель у кроликов с экспериментальной герпесвирусной инфекцией приводило к увеличению уровня IgA как в слёзной

жидкости, так и в сыворотке крови, в то время как введение только одной вакцины HSV-1 не способствовало индукции антигенспецифического Т-клеточного иммунитета. Иммунизация вакциной в сочетании с СрG-ODN индуцировала локальный и системный антигенспецифический ответ Т-клеток, поляризованный по Th1 типу [61].

Ряд работ посвящён обсуждению результатов экспериментальных исследований адъювантного действия ODN в комплексе с разными вариантами антигенов. Так, S. Tengwall et al. [62] для формирования специфического иммунного ответа против HSV-2 использовали гликопротеин D вируса (gID-DNA) и СрG-ODN, при этом адъювант вводили через 48 ч после иммунизации мышей гликопротеином. Введение такой комбинации — нереплицирующегося антигена вируса и СрG-ODN — приводило к развитию сильного иммунного ответа, включающего выработку специфического IgG2c, а также продукцию IFN γ клетками регионарных лимфатических узлов и селезёнки. Авторы подчеркивают перспективность использования СрG-ODN при разработке вакцин против генитального герпеса и других болезней, передаваемых половым путём.

Вместе с тем, несмотря на большое число работ, касающихся адъювантного действия СрG-ODN при герпесвирусных инфекциях, до настоящего времени нет ещё лицензированной противогерпетической вакцины, которая была бы высокоэффективной, безвредной и соответствовала всем требованиям [63].

Гепатит В. Вирусом гепатита В инфицировано в мире около 257 млн человек и примерно 686000 человек ежегодно погибают от этой инфекции [64]. Вакцинация против гепатита В снижает заболеваемость и развитие осложнений инфекции. Однако проблема остаётся нерешённой для тех лиц, которые плохо переносят лицензированные вакцины [65].

Отечественная рекомбинантная вакцина против гепатита В была разрешена к применению в 1986 г. Вакцина представляет собой сорбированный на гидроксиде алюминия поверхностный антиген вируса гепатита В. Активной субстанцией рекомбинантной вакцины является HBsAg, получаемый при культивировании генетически модифицированных дрожжевых клеток или клеток животного происхождения, в которые встроены ген HBsAg (или гены HBsAg/пре-HBsAg). Трансформированные таким образом клетки культивируют и получают высокоиммуногенный рекомбинантный белок HBsAg. В настоящее время в России зарегистрировано 13 вакцин отечественного и зарубежного производства, такие как Регевак-В, Бубо-М, Бубо-КОК, Эбербиовак HB, Энджерикс-В, Эувакс-В, Шанвак-В, Тританрикс HB, Н-В-ВАКС II, GeneVac-В и др.

HBsAg вируса гепатита В, экспрессирующийся на поверхности вирусных частиц и освобождающийся в крови при инфицировании, используется в настоящее время в качестве основного антигенного компонента современных HBV-вакцин.

По данным W. M. Lee [66] примерно у 10% привитых иммунный ответ отсутствует или формируется низкий иммунитет, что, по-видимому, обусловлено феноменом генетической изменчивости вируса. Появление в его геноме мутаций, связанных с «вакцинным бегством», позволяет уклоняться от вакцинассоциированного иммунного ответа и даёт вирусу преимущество в условиях вакцинации против вируса гепатита В.

В связи с этим в разных странах постоянно проводятся исследования, направленные на увеличение эффективности и снижение реактогенности вакцин против гепатита В [67]. Большой интерес в этом плане представляют агонисты Toll-like рецепторов, в частности, агонисты TLR9, используемые в качестве адъювантов [68].

Высокую оценку в качестве адъюванта вакцин против гепатита В получили CpG-ODN. Так, доклинические исследования показали, что CpG 2216 и CpG 2395 увеличивали возможность распознавания HBV эпитопов и в 2–4 раза увеличивали продукцию IFN γ и IL-4 у пациентов с хроническим гепатитом В. У крыс и приматов, получавших вакцину с CpG 2006, наблюдался более высокий дозозависимый иммунный ответ, а также значительно более высокий уровень IgG2B и антител к HBsAg (в 2–10 раз больше) по сравнению с введением одной вакцины [69]. У добровольцев, привитых вакциной с CpG-ODN, регистрировались в 3–10 раз более высокие титры антител против HBsAg, чем при вакцинации вакциной без адъюванта [70, 71].

В работах S. A. Halperin et al. [72, 73] указывается на более высокую эффективность препарата, состоящего из поверхностного антигена вируса гепатита В и агониста TLR9 — иммуностимулирующей последовательности ДНК 1018 (ISS). Было установлено, что препарат HBsAg-ISS был легко переносим пациентами, реакции в месте введения были слабо выраженными и кратковременными. Уровень антител возрастал с повышением дозы комплекса. Двукратная инъекция препарата (0 и 8 неделя) обеспечивала более раннее формирование полноценного иммунного ответа, чем три инъекции лицензированной вакциной против гепатита В (третья — через 24 недели). В другой работе авторы показали, что две инъекции (0 и 4 недели) обеспечивали формирование протективного уровня специфических антител у 94% пациентов, а при использовании схемы введения «0 и 8 недель» — у 100% лиц. Средние геометрические титры антител составляли 244 mIU/ml и 863 mIU/ml, соответственно, $p=0,04$). Полученные

результаты свидетельствуют о том, что использование в качестве адъюванта ДНК-ODN позволяет уменьшить число иммунизаций (с 3 до 2), не снижая качества иммунизации, а также получить более высокий уровень антител, чем при иммунизации лицензированной вакциной.

Этот же агонист TLR9 (последовательности ДНК 1018) использовали в многоцентровом слепо-рандомизированном исследовании R.S. Janssen et al. [74] у пациентов с болезнями почек, получающих гемодиализ. Четырёхразовую иммунизацию двумя дозами лицензированной вакцины они заменили трёхкратной (0, 4 и 24 недели). В результате было установлено, что новый вариант профилактического препарата индуцировал формирование значительно более раннего антигенного ответа и длительную продукцию антител в высоких титрах, чем лицензированная вакцина.

Вакцина может содержать как один, так и несколько адъювантов [4]. Так, R. Madan-Lala et al. [75] представили положительные результаты действия двойной и тройной комбинации адъювантов агонистов TLR: TLR4/TLR9 и TLR4/TLR7/TLR9. Обе комбинации способствовали перекрестному представлению антигена *in vitro*, повышали гуморальный ответ и направляли развитие иммунного ответа по Th1-типу.

Выраженный синергетический иммунный ответ показан при использовании CpG-ДНК в комбинации с квасцами [76]. При этом синергетический эффект наблюдался и в отношении воздействия на экспрессию CD80 и CD86 антигенов [77]. В работе X. Zhang et al. [78] показано, что у всех мышей, получавших 5 мкг CpG ДНК BW006 и вакцину против гепатита В, через 2 недели имел место подъём уровня антител, значительно более высокий, чем у животных, иммунизированных только вакциной. При этом под действием квасцов формировался иммунный ответ Th2-типа, а под действием CpG-ODN — Th1-типа.

В спленоцитах мышей, привитых вакциной с адъювантом, наблюдалось почти 30-кратное увеличение уровня IL-12. Увеличивался также уровень IL-10, играющего важную роль в сохранении баланса Th1/Th2-клеток. Увеличение продукции антител, а также уровня IL-12 и IL-10 могут быть связаны с активацией экспрессии антигенов CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках у животных, получавших вакцину с комбинацией адъювантов [78]. Одновременное введение CpG-ODN с антигеном вируса гепатита В повышает уровень общего IgG, IgG1, IgG2, IL-12 и IFN γ у старых мышей [79].

Следует упомянуть также новый иммуностимулирующий монодисперсный наноконкомпозит CpG-Au@HBs VLP, в котором адъювант CpG-ODN был конъюгирован с Au NP и объединён с генно-инженерными VLP HBs — полыми и ста-

бильными вирусными частицами без генетического материала, обладающими собственной иммуногенностью (действие на В-, Т-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты), вызывающий более значительное увеличение количества CD4+, CD8+ Т-клеток и стимулирующий синтез IFN γ по сравнению с VLP-НВс с обычным адъювантом Фрейнда [80]. Наночастицы Аи, заключённые внутри VLP, защищают молекулы CpG-ODN от деградации.

В настоящее время уже есть первая зарегистрированная в США вакцина «HEPLISAV-B» против гепатита В (Dynavax Technologies Corporation, United States), содержащая в качестве адъюванта CpG-ОДН для профилактики инфекции, вызываемой всеми известными подтипами вируса у взрослых с 18 лет. Уровень защиты при вакцинации «HEPLISAV-B» составляет 95% по сравнению с вакциной «Engerix-B» (81%). Выход вакцины на рынок ожидается в 2018 г.

Таким образом, и при разработке вакцинных препаратов против гепатита В достаточно перспективным является использование CpG-ODN в качестве адъювантов.

Грипп

В настоящее время существует потребность в противогриппозных вакцинах, обуславливающих формирование перекрестного иммунного ответа к штаммам, претерпевшим антигенный дрейф [81]. В России разрешён к применению ряд отечественных и зарубежных вакцин против гриппа для взрослых и детей. Однако учёные стремятся уменьшить рекомендуемую дозу вакцины, не снижая её эффективности. С этой целью в качестве адъювантов применяют CpG-ODN. Так, С. L. Cooper et al. [82] добавляли CpG 7909 (В-класс ODN) к коммерческой убитой трёхвалентной вакцине против гриппа Fluarix plus. В рандомизированное двойное слепое исследование были включены 60 добровольцев. Первая группа ($n=30$) получала Fluarix + 1 мг CpG 7909, а вторая ($n=30$) — Fluarix plus + 0,85% раствор NaCl. При этом добровольцы из 1-й группы получали только 1/10 дозы Fluarix plus, а из второй группы — полную дозу вакцины. Болезненность в месте инъекции и головная боль встречались значительно чаще у лиц, получавших только вакцину. Добавление адъюванта повышало иммуногенность вакцины. Специфические антитела появлялись значительно раньше у лиц, получавших вакцину с CpG-ODN. У добровольцев 1-й группы отмечена значительно более высокая продукция IFN γ , что позволило авторам рекомендовать введение CpG-ODN с вакциной для снижения дозы последней, что, в свою очередь, может уменьшить реакцию на прививку [82].

Большое внимание привлечено к разработке эффективных средств доставки вакцин к антигенпрезентирующим клеткам, в частности, к виросомам — комплексам, состоящим из липидов и

как минимум одного белка вирусной оболочки, т.е. пустым вирусным оболочкам без нуклеокапсида, содержащего генетический материал вируса-источника [83—85]. Виросомы обладают способностью к слиянию, но не способны к самовоспроизведению. В современной вакцинотерапии виросомы являются высокоэффективной системой адъювант/переносчик. А. I. Mallick et al. [83] в экспериментах на цыплятах исследовали иммуногенность виросом птичьего гриппа с включением или без включения рекомбинантного куриного IFN γ или CpG-ODN. Иммунизация птиц виросомами с CpG-ODN обуславливала продукцию самых высоких титров антител, определяемых в реакции торможения гемагглютинации, значительный подъём уровня IgG и IgA антител в сыворотке крови, а также индуцировала антигенспецифическую пролиферацию клеток селезёнки и экспрессию IFN γ [83]. В другом исследовании эти же авторы показали, что виросомы с CpG-ODN значительно снижают вирусную нагрузку после экспериментального заражения цыплят вирусом гриппа, а также повышают уровень экспрессии IFN I и II типов [84].

S. M. Singh et al. [86] предлагают использовать другой носитель — наночастицы PLGA — poly(dl-lactic-Co-glycolic acid) для инкапсулирования CpG-ODN и аэрозольного введения этой конструкции с инактивированной вакциной против птичьего гриппа.

Китайские учёные в экспериментах на цыплятах доказали более значительные ценовые преимущества использования новых CpG-ODN, а, главное, эти дезоксинуклеотиды вызывали значимое увеличение экспрессии mRNA IL-6, IL-12, IFN γ и TLR21 в тканях респираторного тракта птиц в ранний период после интраназальной иммунизации инактивированным вирусом птичьего гриппа H5N1+CpG-ODN. Повышался также уровень вирусспецифических секреторных IgA антител в лаважной жидкости респираторного тракта [87].

М. McCluskie et al. [85] в эксперименте на мышах отмечали повышение эффективности вакцинации гемагглютинином вируса гриппа путём использования двух адъювантов — CpG-ODN и ISCOMATRIX. Вторым адъювантом обладает широким спектром эффектов, в том числе быстрой доставкой антигена дендритным клеткам и ускорением их созревания. ISCOMATRIX активирует систему как врождённого, так и адаптивного иммунитета. Сильный синергетический эффект адъювантов наблюдался в отношении продукции интерферона. Результаты, полученные авторами, показали, что рациональное сочетание разных адъювантов обеспечивает формирование более выраженного иммунного ответа, в том числе Th1-типа. Однако экстраполировать данные результаты на человека пока ещё преждевременно [85].

Синтетические CpG-ODN, а также препараты деринат и ферровир были апробированы в качестве иммуномодуляторов и адъювантов и при других вирусных инфекциях. Так, было установлено, что конструкция рекомбинантных белков — B5 и A-27 вируса оспы с CpG-ODN 7909 приводила к формированию иммунной защиты мышей Balb/c от 100 смертельных доз возбудителя, эквивалентной создаваемой классической противооспенной вакциной [88]. Положительные результаты были получены также при лимфоцитарном хориоменингите, при раке шейки матки, вызванном вирусом папилломы человека [3].

Положительные результаты применения дерината в качестве иммуномодулятора при ОРВИ были получены О. Н. Красноруцкой и соавт. [53], а при хроническом вирусном гепатите С — Н. Б. Волошиной [89] и О. Л. Соболевской [90].

CpG-ODN предлагают использовать и в ветеринарии при респираторных вирусных инфекциях у животных и птиц [91, 92]. Так, интраназальная вакцинация поросят против инфекции, вызванной респираторно-синтициальным вирусом, с включением CpG-ODN в качестве адъюванта индуцировала как системный, так и мукозальный иммунитет. При этом титры антител к вирусу возрастали в 4 раза по сравнению с иммунизацией без адъюванта. Ещё более эффективным было включение в композицию вакцины с CpG-ODN биоразлагаемого носителя вакцины — полифосфазена. В исследовании R. Li et al. [92] представлены эффекты четырёх разных CpG в качестве потенциальных адъювантов в вакцинах для свиней и других сельскохозяйственных животных.

Таким образом, поиск путей и возможностей применения олигонуклеотидов в качестве средств монотерапии, а также для снижения реактогенности и повышения эффективности противовирусных вакцин продолжается.

Сибирская язва

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* по степени значимости относится к первой категории потенциальных биологических агентов биотерроризма [93]. Для иммунопрофилактики сибирской язвы используют вакцину сибиреязвенную живую сухую для накожного (скарификационного) и подкожного применения у лиц от 14 до 60 лет. У вакцинированных лиц формируется специфический иммунитет продолжительностью до одного года.

Во всем мире активно ведутся поиски новых эффективных средств профилактики сибирской язвы, что связано с необходимостью уменьшения числа прививок для получения эффекта, снижения реактогенности вакцины, увеличения срока длительности иммунной защиты. К настоящему времени предложено несколько новых вакцин — комбинированных, химических и рекомбинантных.

Как было показано выше, благодаря включению в состав вакцин CpG-ODN степень выраженности и скорость развития антиген-специфического иммунного ответа увеличиваются, что открывает перспективы создания новых вакцин к возбудителям — возможным агентам биотерроризма, где необходимо быстрое развитие иммунного ответа, в том числе, к сибирской язве.

В настоящее время на стадии клинических испытаний находится препарат AV-7909 — химическая сибиреязвенная вакцина AVA с добавлением CpG 7909 (другое название — CpG 2606) [94, 95].

В рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых клинических испытаниях (1 фаза) добровольцам дважды вводили внутримышечно коммерческую сибиреязвенную вакцину Biothrax или две дозы тоже внутримышечно одной из четырёх композиций AV7909 с CpG адъювантом. Через 24–48 ч в крови наблюдался подъём уровня IP-10 (interferon gamma-induced protein-10), IL-6 и CRP (С-реактивного протеина) с возвращением показателей к исходным значениям к 7-му дню. Иммунизация AVA (без CpG 7909) приводила к повышению только уровня IL-6 и CRP, но не IP-10. Таким образом, приведённые данные свидетельствуют о том, что добавление CpG 7909 к сибиреязвенной вакцине усиливает клеточный ответ организма [95].

В клинических исследованиях других авторов с привлечением здоровых добровольцев наблюдалась ускоренная сероконверсия. У лиц, получавших в качестве контроля вакцину BiothraxR без адъюванта, титр антител достигал пика на 48-й день после инъекции, а у получавших вакцину с адъювантом CpG-ODN максимальный титр антител регистрировался уже на 22-е сутки. Кроме того, добавление CpG-адъюванта индуцировало статистически значимое возрастание титра антител к *B. anthracis* (в 9 раз), а также увеличило число лиц, у которых имел место выраженный IgG иммунный ответ к сибиреязвенному протективному антигену, с 61 до 100% [96, 97].

Наиболее частыми побочными эффектами вакцинации были реакции на месте инъекции, а также транзиторная лимфопения. Композиция AV 7909 обуславливала высокую иммуногенность и низкую реактогенность [97].

С целью сокращения срока формирования врождённого иммунитета в качестве средств доставки антигена или адъюванта испытывают различные наноматериалы. Мы не останавливаемся на характеристике и классификации наночастиц, т.к. этот вопрос исчерпывающе изложен в ряде работ и обзорах литературы [98]. В качестве примера приводим результаты исследований М. А. Kachura et al. [99] и В. Milley et al. [100] адъювантной активности комплекса, состоящего из

растворимых частиц полимера сахарозы Ficoll размером 50 нм и TLR9 лиганда DV 230 (DV 230-Ficoll). Каждая наночастица содержала более 100 молекул TLR-лиганда. Такую композицию авторы использовали для конструирования сибиреязвенной вакцины на основе рекомбинантного защитного антигена (rPA) из *B. anthracis*. Было установлено, что одна иммунизация обезьян комплексом rPA+DV 230-Ficoll индуцировала 10-кратное повышение специфических токсиннейтрализующих антител в течение 2 недель по сравнению с животными, иммунизированными эквивалентными количествами мономерного DV 230. Обезьяны, иммунизированные одно- или двукратно этим комплексом были полностью защищены от аэрозольного заражения 200 LD₅₀ возбудителя. У животных наблюдалась значительная миграция клеток к месту введения и в регионарные лимфатические узлы, усиленное поглощение комплекса антигенпредставляющими клетками, что сопровождалось значительной индукцией экспрессии маркеров созревания дендритных клеток — CD83 и CD86. Такой комплекс более длительное время сохранялся в месте введения и региональном лимфоузле, что способствовало усилению его адъювантной активности, вызывал значительно меньше системных воспалительных реакций, а адъювант DV 230 при всасывании попадал в системный кровоток и концентрировался в селезёнке, печени и почках.

Мелиоидоз

Этиологическим агентом мелиоидоза является факультативный внутриклеточный паразит *Burkholderia pseudomallei*. Болезнь характеризуется высокой летальностью (при септицемии — около 40%) и передаётся пищевым, респираторным и чрезкожным путями [101]. *B. pseudomallei* включен в категорию возбудителей второй группы патогенности и категории В как реальный агент биологического оружия. Вакцины против мелиоидоза, разработанные на основе аттенуированных штаммов или протективных антигенов, имеют низкую эффективность и совершенно бесполезны при аэрогенном заражении, в связи с чем вакцинация против этой болезни не проводится [102]. Однако исследования, связанные с разработкой эффективных вакцин, проводятся достаточно активно. Учёные предполагают, что перспективы в области конструирования новых эффективных вакцин против мелиоидоза лежат в создании химических вакцин на основе конъюгатов CpG-ODN с иммуногенными протеинами или с рекомбинантной ДНК, кодирующей факторы патогенности этого возбудителя. По данным D. M. Estes et al. [103], такие конъюгаты защищали животных не только от парентерального, но и аэрогенного заражения.

Стимуляция иммунной системы CpG-ODN. В настоящее время, активно проводятся исследования по применению CpG-ODN в качестве средства монотерапии для стимуляции иммунной системы и снижения тяжести течения заболеваний. В работе В. М. Judu et al. [104] 8-недельным мышам (самкам) за 48 ч до заражения вирулентным штаммом возбудителя мелиоидоза интраназально вводили 20 мкг CpG-ODN 2137 (тип С). Контрольные мыши, не получавшие CpG-ODN, заболели в течение 48 ч после заражения. Предварительное введение CpG-ODN значительно продлевало жизнь инфицированным животным (от 80 до 100% выживших). С увеличением дозы возбудителя (3 и 4 LD₅₀) протективный эффект несколько снижался (70 и 50% выживших, соответственно). Обработка мышей CpG-ODN после заражения была неэффективной. Бактериальная нагрузка и уровень патологических изменений в лёгких животных, получавших CpG-ODN, были ниже чем в контроле. Отмечен значительный приток нейтрофилов и моноцитов, играющих значительную роль в защите организма от мелиоидоза [105]. Установлено, что условием формирования успешной защиты организма от заражения при помощи CpG-ODN является умеренный, но не высокий подъём уровня цитокинов [106].

В научной литературе последнего десятилетия достаточно широко представлены материалы, касающиеся липосомальных вакцин. Липосомальные препараты без добавления иммуностимулирующих компонентов часто не являются высокоиммуногенными и требуют нескольких инъекций для формирования выраженного иммунного ответа [107]. Иммуногенность их может быть увеличена путём добавления CpG-ODN, который усиливает как клеточно-опосредованный, так и гуморальный антигенспецифический иммунитет [108].

Способ защиты от мелиоидоза (пока нет надёжной вакцины против возбудителя) состоит в том, что CpG-ODN инкорпорируют в катионные липосомы [109]. Такая конструкция создаёт в течение 30 дней 100% защиту мышей от смертельной дозы при заражении мелиоидозом. При этом уже через двое суток наблюдался подъём уровня IFN γ .

Использование CpG-ODN в вакцинных композициях. В экспериментах на мышах показано, что живые аттенуированные мутанты *B. pseudomallei* — наиболее эффективные кандидаты как основа вакцины, т.к. обеспечивают продолжительный гуморальный и клеточный иммунитет. Однако существуют опасения относительно возвращения вирулентности возбудителя или развития скрытой инфекции [110]. В связи с этим разрабатываются неживые варианты, способные создать эффективный защитный иммунитет. Несмотря на то, что

убитые или субъединичные вакцины дают сильный антительный ответ, иммунный ответ Th1-типа не развивается.

ДНК-вакцины перспективны при мелиоидозе, поскольку они способны формировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет [111, 112]. К настоящему времени в единственной ДНК вакцине против мелиоидоза, используется ген флагеллярной субъединицы *VpflC* [111]. CpG-модифицированная плазмидная ДНК, кодирующая флагеллин, повышает иммуногенность и обеспечивает защиту мышей против мелиоидоза при интраназальном или накожном введении [113].

Разработаны разные конструкции ДНК *FliC* вакцины. Все они вызывают значительный IgG ответ против *FliC*, снижают системную продукцию IL-6, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), IFN γ , TNF α , уменьшают бактериальную нагрузку в органах экспериментальных животных по сравнению с контролем. Для дальнейшего изучения отобрана конструкция pVAX-hTPA-*FliC*, индуцирующая снижение бактериальной нагрузки, а также уровня IL-6, CXCL-1 (chemokine -C-X-C motif-ligand-1), TNF α в лёгких. Одна интраназальная доза этой вакцины защищала 53% мышей, заражённых через 14 дней после вакцинации по сравнению с невакцинированными животными [110]. Необходимо отметить тот факт, что исследования, связанные с разработкой новых эффективных вакцин против мелиоидоза проводятся весьма активно в разных странах.

Туберкулёз

По данным ВОЗ, туберкулёз, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis*, остаётся одним из самых опасных инфекционных заболеваний человека, ежегодно уносящим более 1,8 млн жизней во всем мире. Около трети населения имеют латентный туберкулёз.

Единственной применяемой в мире вакциной против туберкулёза является вакцина туберкулёзная сухая (БЦЖ) — живые микобактерии вакцинного штамма БЦЖ-1 (подтип *Mycobacterium bovis*). Вакцина эффективно защищает детей от милиарного туберкулёза, но не предотвращает первичного инфицирования и реактивации латентной лёгочной инфекции — основного источника распространения возбудителя среди населения. Протективный иммунитет, сформированный этой вакциной, со временем снижается и через 10 лет практически исчезает, в результате чего взрослое население становится незащищённым как от первичной инфекции, так и от реактивации латентного туберкулёза [114]. Неблагоприятная эпидемическая ситуация с туберкулёзом, широкое распространение лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя, сочетанных с

туберкулёзом инфекций и, наконец, отсутствие иммунопрофилактических препаратов, эффективных у иммунокомпрометированных лиц, при латентной инфекции и открытых лёгочных формах делают задачу поиска новых вакцин актуальной в настоящее время. Основными направлениями повышения эффективности противотуберкулёзной вакцинации является разработка новых современных вакцинных препаратов, эффективных схем вакцинации, а также подбор оптимального адъюванта, способного стимулировать Т-клеточный ответ. Вопросы создания новых противотуберкулёзных вакцин обобщены в обзорах [115, 116]. В создании новых противотуберкулёзных вакцин находят своё место в качестве эффективных адъювантов и CpG-ODN.

Как и при других инфекционных заболеваниях, при туберкулёзе использование ODN в качестве средства монотерапии создаёт эффективную защиту против болезни [117]. На протяжении 5 недель после интраназального заражения туберкулёзными бактериями мышей, получивших CpG-ODN, регистрировалась сниженная бактериальная нагрузка в лёгких, что связано со снижением интенсивности воспалительного процесса в этом органе, с увеличением продукции IFN γ , способности спленоцитов секретировать цитокины, а также со снижением уровня IL-4 в лёгочной ткани. О значении IFN γ в защите от туберкулёза свидетельствует тот факт, что у мышей, дефицитных по гену IFN γ , бактериальная нагрузка в лёгких не снижалась. При двукратном введении CpG-ODN (0, 2 недели) остались в живых 100% животных, в то время как в контрольной группе 40% мышей погибли. Близкие результаты получены и другими авторами [118, 119].

Как в эксперименте, так и в клинике доказано благоприятное действие дерината у пациентов с различными формами туберкулёзного процесса. Так, по данным А. В. Мордык и соавт. [120] введение этого препарата больным способствует уменьшению индекса поражения лёгочной ткани туберкулёзным процессом, уменьшению выраженности специфического воспаления, смене экссудативного характера воспалительного процесса на продуктивный. В результате применения препарата уменьшалась выраженность фиброза в лёгочной ткани и наблюдался более благоприятный исход комплексного лечения туберкулёза лёгких. Т. Sato et al. [121] сообщают, что репаративное действие дерината связано с его воздействием на макрофаги через TLR9-рецепторы, что приводит к усилению или секреции факторов, отвечающих за репарацию тканей (фактора роста эндотелиоцитов — VEGF) и, следовательно, процесса неоангиогенеза.

Высокая клиническая эффективность и безопасность дерината показана в комплексном лече-

нии больных туберкулёзом лёгких. У пациентов в процессе лечения снижалось число осложнений в ранний и отсроченный послеоперационный период, сокращался срок госпитализации, значительно быстрее восстанавливалась белково-синтетическая функция печени [122].

CrG-ODN включают в состав разрабатываемых вакцин против туберкулёза [115, 116]. На первой фазе клинических испытаний находится рекомбинантный белок, полученный слиянием микобактериальных антигенов — белков Ag85B, ESAT6 и Rv2660 (белок латентной фазы) в сочетании с IC31 (IC31 — CrG-ODN, иммобилизованные на поликатионном пептиде KKK), обладающий высокой иммуностимулирующей активностью и безопасностью [123].

На второй фазе клинического исследования находится кандидат в вакцины Hybrid+ — рекомбинантный белок, полученный слиянием микобактериальных антигенов — белков Ag85B и ESAT6 в сочетании с адъювантом IC31 на основе полилизинового пептида, на поверхности которого иммобилизованы CrG-ODN. Указанное соединение предназначено для взрослых и лиц подросткового возраста.

Таким образом, олигонуклеотиды находят своё применение как для монотерапии различных форм туберкулёза, так и в качестве адъюванта во вновь разрабатываемых противотуберкулёзных вакцинах.

Дезоксинуклеотиды различного происхождения испытывали и при других бактериальных инфекциях — сальмонеллёзах (сублингвальная ультразвуковая вакцина +CrG) [124], эшерихиозах (CrG в качестве монотерапии при экспериментальном эшерихиозном менингоэнцефалите) [125], туляремии (в качестве средства монотерапии туляремии у мышей) [126], бруцеллёзе (в качестве адъюванта) [127], коклюше (включение в вакцину) [128, 129], дифтерии (в качестве мукозального адъюванта) [130].

Заключение

Как следует из приведённых в обзоре материалов, до настоящего времени остается актуальной проблема улучшения существующих и создания новых профилактических препаратов для борьбы с инфекционными заболеваниями. На различных стадиях испытаний находится достаточно много современных адъювантов, которые не только усиливают поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, или доставляют его в места локализации иммунокомпетентных клеток, но и являются иммуностимуляторами. Большой интерес в этом плане представляют бактериальная ДНК с высоким содержанием CrG-мотивов, а также неметилированные CrG-динуклеотиды, стимулирующие систему как врождённого, так и

адаптивного иммунного ответа. Внимание учёных к этим соединениям определяется отсутствием у них выраженной токсичности и хорошей переносимостью [18, 19]. Кроме того, под действием CrG-мотивов наступает быстрая иммунная перестройка, что очень важно при создании вакцин против возбудителей быстро распространяющихся инфекционных заболеваний (вызывающих эпидемии и пандемии, используемых в террористических актах и пр.).

Однако молекулы CrG-ODN заряжены отрицательно и поэтому с трудом проникают через клеточные мембраны, имеющие аналогичный поверхностный заряд. Кроме того природные CrG-ODN легко расщепляются нуклеазами. Одним из эффективных способов защиты CrG-ODN от деградации нуклеазами является химическая модификация сахарофосфатного скелета, что может привести к серьёзным побочным эффектам. Всё это диктует необходимость разработки эффективных систем доставки CrG-ODN в ткани и клетки-мишени. Прогресс в области нанотехнологий представил возможности для инкапсулирования CrG-ODN в различные наноразмерные транспортные системы, а также для синтеза из CrG-ODN разнообразных по форме наноразмерных структур. CrG-ODN можно инкапсулировать в различные наноразмерные транспортные системы, что повышает как стабильность, так и степень интенсивности их интернализации в АПК. Кроме того наночастицы сами по себе могут вызывать усиление иммунных реакций [131].

К настоящему времени уже существуют лицензированные вакцины, предназначенные для человека, которые созданы на основе наночастиц. Это вакцина против вируса гепатита В [132]; две вакцины против вируса папилломы человека (Cervarix и Gardasil) [133]; вакцина против гепатита Е, лицензированная только в Китае [134]; вакцина против малярии (Mosquirix, GlaxoSmithKline) [135].

Что касается CrG-мотивов ДНК эукариот, то доказана возможность их использования в качестве иммуномодуляторов, противовирусных и противобактериальных соединений, в связи с чем на их основе разработаны лекарственные препараты, БАД к пище и продукты функционального питания. Особый интерес они вызывают ещё и потому, что получают их из морских гидробионтов, а морская фауна (микроорганизмы, беспозвоночные животные, рыбы) является неисчерпаемым источником новых биологически активных веществ. Исследования же ДНК из эукариот и прокариот — морских гидробионтов фактически только начинаются. ДНК из этих морских объектов может быть источником как эффективных адъювантов, так и иммуномодуляторов, противовирусных и противобактериальных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Медуницын Н.В. Вакцинология. 3-е издание переработанное и дополненное. М.: Триада-Х, 2010. — 512 с. / Medunitsyn N.V. Vaktsinologiya. 3-e izdanie pererabotannoe i dopolnennoe. M.: Triada-KH, 2010; 512. [in Russian]
2. Семакова А.П., Микшиш Н.И. Адьювантные технологии в создании современных вакцин. Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — С. 2. — С. 28–35. / Semakova A.P., Mikshish N.I. Adyuvantnye tekhnologii v sozdanii sovremennykh vaktsin. Problemy osobo opasnykh infektsij 2016; 2: 28–35. [in Russian]
3. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.: ГЭОТАР-медиа, 2011. — 608 с. / Petrov R.V., Khaitov R.M. Immunogeny i vaktsiny novogo pokoleniya. M.: GEOTAR-media, 2011; 608. [in Russian]
4. Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Бондарев В.П., Волкова Р.А., Лонская Н.И., Лебединская Е.В. и соавт. Вакцины с адьювантами. Доклинические исследования. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. — 2015. — № 1. — С. 15–20. / Avdeeva ZH.I., Alpatova N.A., Bondarev V.P., Volkova R.A., Lonskaya N.I., Lebedinskaya E.V. i soavt. Vaktsiny s adyuvantami. Doklinicheskie issledovaniya. Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie 2015; 1: 15–20. [in Russian]
5. Lee S., Nguyen M.T. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. Immune Network 2015; 15: 51–57. DOI: 10.4110/in.2015.15.2.51
6. Dubensky T.W. Jr, Reed S.G. Adjuvants for cancer vaccines. Seminars in Immunology 2010; 22: 3: 155–161. DOI: 10.1016/j.smim.2010.04.007
7. Sivakumar S.M., Safhi M.M., Kannadasan M., Sukumaran N. Vaccine adjuvants — current status and prospects on controlled release adjuvancity. Saudi Pharmaceutical Journal 2011; 19: 4: 1197–206. DOI: 10.1016/j.jsps.2011.06.003
8. Reed S.G., Orr M.T., Fox C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. Nature Medicine 2013; 19: 12: 1597–1608. DOI: 10.1038/nm.3409
9. Boyle J., Eastman D., Millar C., Camuglia S., Cox J., Pearce M. et al. The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. Vaccine 2007; 25: 2541–2544. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.018
10. Ghimire T.R. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. Springer Plus 2015; 4: 1: 1–18. DOI: 10.1186/s40064-015-0972-0
11. Shaw C., Petrik M. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. J Inorg Biochem 2009; 103: 11: 1555–1562. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2009.05.019
12. Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М. Адьюванты в составе вакцин. Иммунология. — 2011. — № 1. — С. 37–45. / Ataullakhanov R.I., Khaitov R.M. Adyuvanty v sostave vaktsin. Immunologiya 2011; 1: 37–45. [in Russian]
13. Исаенко Е.Ю., Бабич Е.М., Елисеева И.В., Ждмарова Л.А., Белозерский В.И., Колпак С.А. Адьюванты в современной вакцинологии. Annals of Mechnikov Institute. — 2013. С. 4. — С. 5–21. / Isaenko E.YU., Babich E.M., Eliseeva I.V., Zhdamarova L.A., Belozerskiy V.I., Kolpak S.A. Adyuvanty v sovremennoj vaktsinologii. Annals of Mechnikov Institute 2013; 4: 5–21. [in Russian]
14. Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Юлиш Е.И. Лекарственные средства, модулирующие активность TLR. Здоровье ребенка. — 2014. — Т. 6. — № 57. — С. 131–136. / Abaturv A.E., Volosovets A.P., Yulish E.I. Lekarsvennye sredstva, moduliruyushchie aktivnost' TLR. Zdorov'e rebenka 2014; 6: 57: 131–136. [in Russian]
15. Egli A., Santer D., Barakat K., Zand M., Levin A., Vollmer M. et al. Vaccine adjuvants — understanding molecular mechanisms to improve vaccines. Swiss Medical Weekly 2014; 144: 13940. DOI: 10.4414/sm.w.2014.13940
16. Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annual Review of Immunology 2002; 20: 709–760. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
17. Jahrsdorfer B., Weiner G. CpG oligodeoxynucleotides as immunotherapy in cancer. Update on Cancer Therapeutics 2006; 3: 1: 27–32. DOI: 10.1016/j.uct.2007.11.003
18. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert Review of Vaccines 2011; 10: 499–511. DOI: 10.1586/erv.10.174
19. Iho S., Maeyama J.-I., Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. Human Vaccines & Immunotherapeutics 2015; 11: 3: 755–760. DOI: 10.1080/21645515.2014.1004033
20. Серебряная Н.Б., Новик А.А. ДНК как иммуностимулятор (обзор литературы). Медицинская иммунология. — 2001. — Т. 3. — № 1. — С. 27–34. / Serebryanaya N.B., Novik A.A. DNK kak immunostimulyator (obzor literatury). Meditsinskaya immunologiya 2001; 3: 1: 27–34. [in Russian]
21. Серебряная Н.Б., Калинина Н.М. Иммуномодулирующая активность и эффективность использования в терапии воспалительных заболеваний препаратов нативной ДНК: дерината и ферровира. Успехи современного естествознания. — 2006. — № 4. — С. 92–92. / Serebryanaya N.B., Kalinina N.M. Immunomoduliruyushchaya aktivnost' i effektivnost' ispol'zovaniya v terapii vospalitel'nykh zabolevaniy preparatov nativnoy DNK: derinata i ferrovira. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2006; 4: 92–92. [in Russian]
22. Федянина Л.Н. Иммуномодулирующая активность низкомолекулярной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из молок лососевых рыб. Дисс. ... докт. мед. наук. Владивосток. — 2007. — 269 с. / Fedyanina L.N. Immunomoduliruyushchaya aktivnost' nizkomolekulyarnoy dezoksiribonukleinovoy kisloty (DNK) iz molok lososevykh ryb. Diss. ... dokt. med. nauk. Vladivostok; 2007; 269. [in Russian]
23. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. Природный модификатор функций врожденного иммунитета. ДНК из молок дальневосточных лососей. Владивосток: Медицина ДВ. — 2010; 191. / Besednova N.N., Epshtein L.M. Prirodnyy modifikator funktsij vrozhdennogo immuniteta. DNK iz molok dal'nevostochnykh lososej. Vladivostok: Meditsina DV; 2010; 191. [in Russian]
24. Русина Т.В. Роль Toll-подобных рецепторов 9 типа (TLR9) в реализации иммунотропных эффектов натриевой соли ДНК эукариот в системе in vitro. Дисс. ... канд. биол. наук. Краснодар; 2016 — 127. / Rusinova T.V. Rol' Toll-podobnykh retseptorov 9 tipa (TLR9) v realizatsii immunotropnykh effektivov natrievoy soli DNK eukariot v sisteme in vitro. Diss. ... kand. biol. nauk. Krasnodar; 2016; 127. [in Russian]
25. Dalpke A., Heeg K. CpG DNA as immune response modifier. International Journal of Medical Microbiology 2004; 294: 5: 345–354. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.07.005
26. Anemiya K., Meyers J., Rogers T., Fast R., Bassett A., Worsham P. et al. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the Yersinia pestis FF1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. Vaccine 2009; 27: 16: 2220–2229. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016
27. Samulowitz U., Weber M., Weeratna R., Uhlmann E., Noll B., Krieg A.M. et al. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. Oligonucleotides 2010; 20: 93–101. DOI: 10.1089/oli.2009.0210
28. Vollmer J., Krieg A.M. Immunotherapeutic applications of oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. Advanced Drug Delivery Reviews 2009; 61: 195–204. DOI: 10.1016/j.addr.2008.12.008
29. Yamamoto S., Yamamoto T., Shimada S., Kuramoto E., Yano O., Kataoka T. et al. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. Microbiology and Immunology 1992; 36: 983–997. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02102.x
30. Олишевский С.В., Козак В.В., Яшин Ю.В., Рыбалко С.Л., Шляховенко Л.А. Иммуностимулирующая CpG ДНК: перспективы клинического применения в онкологии. Онкология. — 2006. — Т. 8. — № 2. — С. 209–2017. / Olisheskiy S.V., Kozak V.V., Yashin YU.V., Rybalko S.L., SHlyahovenko L.A. Immunostimuliruyushchaya SpG DNK: perspektivy klinicheskogo primeneniya v onkologii. Onkologiya 2006; 8: 2: 209–2017. [in Russian]
31. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. Nature Immunology 2010; 11: 373–384. DOI: 10.1038/ni.1863
32. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. Biochemical Journal 2009; 420: 1: 1–16. DOI: 10.1042/BJ20090272
33. Ohto U., Shibata T., Tanji H., Ishida H., Krayukhina E., Uchiyama S. et al. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. Nature 2015; 520: 7549: 702–705. DOI: 10.1038/nature14138
34. Ewald S.E., Lee B.L., Lau L., Wickliffe K.E., Shi G.P., Chapman H.A. et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. Nature 2008; 456: 658–662. DOI: 10.1038/nature07405
35. Scheiermann J., Klinman D.M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. Vaccine 2014; 32: 48: 6377–6389. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.06.065
36. Jakob T., Walker P.S., Krieg A.M., Udey M.C., Vogel J.C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG—containing oligodeoxynucleotides of Th1 responses by immunostimulatory DNA. Journal of Immunology 1998; 161: 3042–3049.
37. Klinman D., Shiota H., Tross D., Sato T., Klachik S. Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation. Journal of Leucocyte Biology 2008; 84: 958–964. DOI: 10.1189/jlb.1107775
38. Klinman D.M., Sato T., Shimosato T. Use of nanoparticles to deliver immunomodulatory oligonucleotides. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2017; 46: 158–196. DOI: 10.1002/wnan.1382
39. Серебряная Н.Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа. Иммунология. — 2010. — Т. 31. — № 5. — С. 273–281. / Serebryanaya N.B. Nukleotidy kak regulatory immunogo otveta. Immunologiya 2010; 31: 5: 273–281. [in Russian]
40. Филатов О.Ю., Кашаева О.В., Бугримов Д.Ю., Климович А.А. Морфологические принципы иммунологического действия ДНК эукариот. Российский иммунологический журнал. — 2013. —

- T. 7. — № 16 (4). — С. 385–390. / Filatov O.YU., Kashaeva O.V., Bugrimov D.YU., Klimovich A.A. Morfologicheskie printsipy immunologicheskogo dejstviya DNK ehukariot. Rossijskij immunologicheskij zhurnal 2013; 7: 16: 4: 385–390. [in Russian]
41. *Потапова В.В.* Иммуномодулирующие и радиозащитные свойства ДНК из молок лососевых рыб. Дисс. ... канд. мед наук. Владивосток; 2008. — 158 с. / Potapova V.V. Immunomoduliruyushchie i radiozashchitnye svoystva DNK iz molok lososevykh ryb. Diss. ... kand. med nauk. Vladivostok; 2008; 158. [in Russian]
42. *Шутикова А.Л.* Иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства биологически активных веществ из морских гидробионтов и их использование в гериатрической практике. Дисс. ... канд. мед наук. Владивосток; 2009; 137. / Shutikova A.L. Immunomoduliruyushchie i antioksidantnye svoystva biologicheskii aktivnykh veshchestv iz morskikh gidrobiontov i ikh ispol'zovanie v geriatricheskoj praktike. Diss. ...kand. med nauk. Vladivostok; 2009; 137. [in Russian]
43. *Половинкина В.С., Марков Е.Ю.* Структура и иммуноадьювантные свойства CPG-ДНК. Медицинская иммунология 2010; 12: 6: 469–476. DOI: 10.15789/1563-0625-2010-6-469-476. / Polovinkina V.S., Markov E.YU. Struktura i immunoadyuvantnye svoystva CPG-DNK. Meditsinskaya immunologiya 2010; 12: 6: 469–476. DOI: 10.15789/1563-0625-2010-6-469-476. [in Russian]
44. *Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M.* Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. PLOS ONE 2012; 10: 5: e0128615. DOI: 10.1371/journal.pone.0114989
45. *Исаков В.А., Исаков Д.В.* Патогенез и лечение социально значимых вирусных урогенитальных инфекций (герпеса и папилломавирусной инфекции). Клиническая фармакология и терапия. — 2014. — Т. 23. — № 1. — С. 7–13. / Isakov V.A., Isakov D.V. Patogenezi i lechenie sotsial'no znachimykh virusnykh urogenital'nykh infektsij (gerpesa i papillomavirusnoj infektsii). Klinicheskaya farmakologiya i terapiya 2014; 23: 1: 7–13. [in Russian]
46. *Sajic D., Patric A.J., Rosenthal K.L.* Mucosal delivery of CpG oligodeoxynucleotides expands functional dendritic cells and macrophages in the vagina. Immunology 2005; 114: 2: 213–224. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.02081.x
47. *Ashkar A.A., Bauer S., Mitchell V.J., Vieira J., Rosenthal K.L.* Local delivery CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry, of Herpes simplex virus type 2. Journal of Virology 2003; 77: 16: 8948–8956. DOI: 10.1128/JVI.77.16.8948–8956.2003
48. *Harandi A.M., Eriksson K., Holmgren J.* A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. Journal of Virology 2003; 77: 2: 953–962. DOI: 10.1128/JVI.77.2.953-962.2003
49. *De Stasio P.R., Taylor M.V.* Specific effect of interferon on the herpes simplex virus type 1 transactivation event. Journal of Virology 1990; 64: 6: 2588–2593.
50. *Rothlein R., Dustin M.L., Martin S.D., Springer T.A.* A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. Journal of Immunology 1986; 137: 4: 1270–1274.
51. *Каплина Э.Н., Чернова В.Н.* Применение дерината в хирургии. Тверь: Триада; 2008. — 64 с. / Kaplina E.N., Chernova V.N. Primenenie derinata v khirurgii. 2008. Tver': Triada; 64.
52. *Громов Р.И.* Иммуномодуляторы и активаторы репарации в хирургии. Поликлиника. — 2009. — № 3. — С. 7–10. / Gromov R.I. Immunomodulatory i aktivatory reparatsii v khirurgii. Poliklinika 2009; 3: 7–10. [in Russian]
53. *Красноруцкая О.Н., Филин Ф.Ф., Бугримов Д.Ю.* Динамика патоморфологических критериев репаративного действия ДНК эукариот в педиатрической практике. Научный альманах. — 2016. — Т. 2. — № 3. — С. 16: 94–97. / Krasnorutskaya O.N., Filin F.F., Bugrimov D.YU. Dinamika patomorfologicheskikh kriteriev reparativnogo dejstviya DNK ehukariot v pediatricheskoj praktike. Nauchnyj al'manakh 2016; 2: 3: 16: 94–97. [in Russian]
54. *Сморчков А.А., Князькин И.В., Зезюлин П.М.* Проблема семейного герпеса. Терапия препаратом ферровир. Вестник Российского государственного медицинского университета 2009. — № 5. — С. 53–55. / Smorchkov A.A., Knyaz'kin I.V., Zezyulin P.M. Problema semejnogo gerpesa. Terapiya preparatom ferrovir. Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta 2009; 5: 53–55. [in Russian]
55. *Чернова Н.И., Перламутров Ю.Н.* Опыт применения противовирусных препаратов с прямым и опосредованным действием в терапии пациентов с рецидивирующим генитальным герпесом. TERRA MEDICA: Всероссийский междисциплинарный медицинский журнал 2015. — Т. 1. — № 2. — С. 54–59. / Chernova N.I., Perlamutrov Yu.N. Opyt primeneniya protivovirusnykh preparatov s pryamym i oposredovannym dejstviem v terapii patsientov s retsidi-viruyushchim genital'nym herpesom. TERRA MEDICA: Vserossijskij mezhdistsiplinarnyj meditsinskij zhurnal 2015; 1: 2: 54–59. [in Russian]
56. *Минаев Н.Н., Бугримов Д.Ю., Климович А.А.* Влияние иммуномодулирующей терапии на удлинение периода ремиссии у пациенток с рецидивирующим генитальным герпесом. Российский вестник акушера-гинеколога. — 2015. — № 4. — С. 65–74. DOI: 10.17116/rosakush201515465-74. / Minaev N.N., Bugrimov D.YU., Klimovich A.A. Vliyanie immunomoduliruyushchej terapii na удlinenie perioda remissii u patsientok s retsidi-viruyushchim genital'nym herpesom. Rossijskij vestnik akushera-ginekologa 2015; 4: 65–74. DOI: 10.17116/rosakush201515465-74 [in Russian]
57. *Бехало В.А., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В.* Инновационные технологии в развитии мукозных вакцин. Механизмы иммунной защиты против Herpes simplex virus и Chlamydia trachomatis. Вестник РАЕН. — 2010. — № 4. — С. 75–80. / Bekhalo V.A., Sysolyatina E.V., Nagurskaya E.V. Innovatsionnye tekhnologii v razvitii mukozykh vaktsin. Mekhanizmy immunoj zashchity protiv Herpes simplex virus i Chlamydia trachomatis. Vestnik RAEN 2010; 4: 75–80. [in Russian]
58. *Gallichan W.S., Woolstencroft R.N., Guarasci T., Mc Cluskie M.J., Davis H.L., Rosenthal K.L.* Intranasal Immunization with CpG Oligodeoxynucleotides as an Adjuvant Dramatically Increases IgA and Protection Against Herpes Simplex Virus-2 in the Genital Tract. J Immunology 2001; 166: 5: 3451–3457 DOI: 10.4049/jimmunol.166.5.3451
59. *Holmberg S.D., Stewart J.A., Gerber A. R., Byers R.H., Lee F.K., O'Malley P.M. et al.* Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor for HIV infection. J American Med Association 1988; 259: 1048–1050. DOI: 10.1001/jama.1988.03720070048033
60. *Hook E.W., Cannon R.O., Nahmias A.J., Lee F.F., Campbell C.H. Jr., Glasser D. et al.* Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. Journal of Infectious Diseases 1992; 165: 251–255.
61. *Nesburn A.B., Bettahi I., Zhang X. Zhu X., Chamberlain W., Affifi R.E. et al.* Topical/mucosal delivery of sub-unit vaccines that stimulate the ocular mucosal immune system. The Ocular Surface 2006; 4: 4: 178–187. DOI: 10.1016/S1542-0124(12)70164-7
62. *Tengvall S., Josefsson A., Holmgren J., Harandi A.M.* CpG oligodeoxynucleotide augments HSV-2 glycoprotein D DNA vaccine efficacy to generate T helper 1 response and subsequent protection against primary genital herpes infection in mice. Journal of Reproductive Immunology 2005; 68: 1: 2: 53–69. DOI: 10.1016/j.jri.2005.06.010
63. *Hensel M.T., Marshall J.D., Dorwart M.R., Heeke D.S., Rao E., Tummala P. et al.* Prophylactic herpes simplex virus 2 (HSV-2) vaccines adjuvanted with stable emulsion and Toll-like receptor 9 agonist induce a robust HSV-2 specific cell-mediated immune response, protect against symptomatic disease, and reduce the latent viral reservoir. J Virology 2017; 91: 9: e2257–16. DOI: 10.1128/JVI.02257-16
64. *Всемирная организация здравоохранения.* Информационный бюллетень. Гепатит В. Апрель 2017. / Vsemirnaya organizatsiya zdoravookhraneniya. Informatsionnyj byulleten'. Gepatit V. Aprel' 2017.
65. *Scheierrmann J., Klinman D.M.* Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. Vaccine 2014; 32: 48: 6377–6389. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.06.065
66. *Lee N.M.* Hepatitis B virus infection. New England Journal of Medicine 1997; 337: 24: 1733–1745. DOI: 10.1056/NEJM199712113372406
67. *Cooper C., Mackie D.* Hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine: a review of HEPLISAVTM safety and efficacy. Expert Review of Vaccines 2011; 10: 4: 417–427. DOI: 10.1586/erv.10.162
68. *Toussi D.N., Massari P.* Immune adjuvant effect of molecularly-defined Toll-like receptor ligands. Vaccines (Basel). 2014; 2 (2): 323–353. DOI: 10.3390/vaccines2020323
69. *Klinman D.M., Tross D., Klaschik S., Shiota H., Sato T.* Therapeutic applications and mechanisms underlying the activity of immunosuppressive oligonucleotides. Annals of the New York Academy of Sciences 2009; 1175: 80–88. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04970.x
70. *Overstreet M.G., Freyberger H., Cockburn I.A., Chen Y.C., Tse S.W., Zavala F.* CpG-enhanced CD8+ T-cell responses to peptide immunization are severely inhibited by B cells. European Journal of Immunology 2010; 40: 124–133. DOI: 10.1002/eji.200939493
71. *Muraoka D., Kato T., Wang L., Maeda Y., Noguchi T., Harada N. et al.* Peptide vaccine induces enhanced tumor growth associated with apoptosis induction in CD8+ T cells. Journal of Immunology 2010; 185: 6: 3768–3776. DOI: 10.4049/jimmunol.0903649
72. *Halperin S.A., Van Nest G., Smith B., Abtahi S., Whiley H., Eiden J.J.* A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. Vaccine. 2003; 21: 2461–2167. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00045-8
73. *Halperin S.A., McNeil S., Langley J.M., Smith B., MacKinnon-Cameron D., McCall-Sani R. et al.* Safety and immunogenicity of different two-dose regimens of an investigational hepatitis B vaccine (hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxy ribonucleotide) in healthy young adults. Vaccine 2012; 30: 3: 6: 5445–5448. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.05.074

74. Janssen R.S., Mangoo-Karim R., Pergola P.E., Girndt M., Namini H., Rahman S. et al. Immunogenicity and safety of an investigational hepatitis B vaccine with a toll-like receptor 9 agonist adjuvant (HBsAg-1018) compared with a licensed hepatitis B vaccine in patients with chronic kidney disease. *Vaccine* 2013; 31: 46: 5306–5313. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.067
75. Madan-Lata R., Pradhan P., Rou K. Combinatorial delivery of dual and triple TLR agonist via polymeric pathogen-like particles synergistically enhances innate and adaptive immune responses. *Scientific Reports* 2017; 7: 2530. DOI: 10.1038/s41598-017-02804-y
76. Seeff L.B., Curto T.M., Szabo G., Everson G.T., Bonkovsky H.L., Dienstag J.L. et al. Herbal product use by persons enrolled in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (HALT-C) Trial. *Hepatology* 2008; 47: 2: 605–612. DOI: 10.1002/hep.22044
77. Mauri J.M., Valles M. Effects of recombinant interleukin-2 and revaccination for hepatitis B in previously vaccinated, non-responder, chronic uraemic patients Collaborative Group of Girona. *Nephrology Dialysis Transplantation* 1997; 12: 4: 729–732.
78. Zhang X., He P., Hu Z., Wang X., Liang Z. Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen and HB vaccine. *Virology Journal* 2011; 8: 78–84. DOI: 10.1186/1743-422X-8-78
79. Qin W., Jiang J., Chen Q., Yang N., Wang Y., Wei X. et al. CpG ODN enhances immunization effects of hepatitis B vaccine in aged mice. *Cellular & Molecular Immunology* 2004; 1: 2: 148–152.
80. Wang Y., Wang Y., Kang N., Liu Y., Shan W., Bi S. et al. Construction and immunological evaluation of CpG–Au/HBc virus-like nanoparticles as a potential vaccine. *Nanoscale Research Letters* 2016; 11: 338. DOI: 10.1186/s11671-016-1554-y
81. Soema P.C., Compier R., Amorij J.P., Kersten G.F. Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015; 94: 251–263.
82. Cooper C.L., Davis H.L., Morris M.L., Efler S.M., Krieg A.M., Li Y. et al. Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluorix influenza vaccine. *Vaccine* 2004; 22: 23–24: 3136–3143. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.01.058
83. Mallick A.I., Parvizi P., Read L.R., Nagy E., Behboudi S., Sharif S. Enhancement of immunogenicity of a virosome-based avian influenza vaccine in chickens by incorporating CpG-ODN. *Vaccine* 2011; 29: 8: 1657–1665. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.12.046
84. Mallick A.I., Kulkarni R.R., Paul S.M., Parvizi P., Nagy E., Behboudi S. et al. Vaccination with CpG-adjuvanted avian influenza virosomes promotes antiviral immune responses and reduces virus shedding in chickens. *Viral Immunology* 2012; 25: 3: 226–231. DOI: 10.1089/vim.2011.0085
85. McCluskie M., Weeratna R.D., Evans D.M., Makinen S., Drane D., Davis H.L. CpG ODN and ISKOMATRIX adjuvant combination inducing strong T-cell IFN γ responses. *BioMed Research International* 2013; Article ID 636847, 11 page. DOI: 10.1155/2013/636847
86. Singh S.M., Alkie T.N., Abdelaziz K.T., Hodgins D.C., Novy A., Nagy E. et al. Characterization of immune responses to an inactivated avian influenza virus vaccine adjuvanted with nanoparticles containing CpG ODN. *Viral Immunology* 2016; 29: 5: 269–275. DOI: 10.1089/vim.2015.0144
87. Fu J., Liang J., Kang H., Lin J., Yu Q., Yang Q. Effects of different CpG oligodeoxynucleotides with inactivated avian H5N1 influenza virus on mucosal immunity of chickens. *Poultry Science* 2013; 92: 11: 2866–2875. DOI: 10.3382/ps.2013-03205
88. Reeman S., Gates A.J., Pulford D.J., Krieg A., Ulaeto D.O. Protection of mice from lethal vaccinia virus infection by vaccinia virus protein subunits with a CpG adjuvant. *Viruses* 2017; 9: 378–393. DOI: 10.3390/v9120378
89. Волошина Н.Б. Опыт применения Ферровира в терапии хронического вирусного гепатита С. *Мир вирусных гепатитов*. — 2009. — № 1. — С. 19–22. / Voloshina N.B. Opyt primeneniya Ferrovira v terapii khronicheskogo virusnogo gepatita S. *Mir virusnykh gepatitov* 2009; 1: 19–22.
90. Соболевская О.Л. Применение препарата «ферровир» у больных хроническим гепатитом С и хроническим микст-гепатитом В+С. *Медицинский альманах*. — 2011. — Т. 6. — № 19. — С. 267–268. / Sobolevskaya O.L. Primenenie preparata «ferrovir» u bol'nykh khronicheskim gepatitom S i khronicheskim mikst-gepatitom V+S. *Meditinskij al'manakh* 2011; 6: 19: 267–268. [in Russian]
91. Gursel M., Klinman D.M. Chapter 62 — Use of CpG oligonucleotides as mucosal adjuvants. In: Mestecky J., Strober W., Russell M.W., Cheroutre H., Lambrecht B.N., Kelsall B.; editors. *Mucosal Immunology* (Fourth Edition). Academic press is an imprint of Elsevier; 2015; 1201–1209. DOI: 10.1016/B978-0-12-415847-4.00062-8
92. Li R., Zhang L., Shi P., Deng H., Li Y., Ren J. et al. Immunological effects of different types of synthetic CpG oligodeoxynucleotides on porcine cells. *RSC Advances* 2017; 7: 43289–43299. DOI: 10.1039/c7ra04493c
93. Онищенко Г.Г., Топорков А.В., Липницкий А.В., Викторов Д.В. Проблемы противодействия биологическому терроризму на современном этапе. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. — 2016. — Т. 1 — № 14. — С. 24–31. / Onishchenko G.G., Toporkov A.V., Lipnitskiy A.V., Viktorov D.V. Problemy protivodejstviya biologicheskomu terrorizmu na sovremennom etape. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye* 2016; 1: 14: 24–31. [in Russian]
94. Rynkevicius D., Rathkopf M., Sim I.A., Waytes A.T., Hopkins R.J., Giri L. et al. Marced enhancement of the immune response to BioTraxR (Anthrax Vaccine Adsorbed) by the TLR9 agonist CpG 7909 in healthy volunteers. *Vaccine* 2011; 29: 6313–6320. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.047
95. Minang J.T., Inglefield J.R., Harris A.M., Lathey J.L., Alleva D.G., Sweeney D.L. et al. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with anthrax vaccine adsorbed plus CpG 7909 (AV 7909). *Vaccine* 2014; 32: 50: 6847–6854. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.01.096
96. Vollmer J., Krieg A.M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 195–204. DOI: 10.1016/j.addr.2008.12.008
97. Hopkins R.J., Daczowski N.F., Kaptur P.E., Museet D., Sheldon E., LaForce C. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, safety and immunogenicity study of 4 formulations of anthrax vaccine adsorbed plus CpG 7909 (AV 7909) in healthy adult volunteers. *Vaccine* 2013; 31: 30: 3051–3058. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.04.063
98. Gomes A., Mohsen M., Bachmann M.F. Harnessing nanoparticles for immunomodulation and vaccines. *Vaccines (Basel)* 2017; 5: 1: E6. DOI: 10.3390/vaccines5010006
99. Kachura M.A., Hickie C., Kell S.A., Sathe A., Calacsan C., Kiwan R. et al. A CpG–Ficoll nanoparticle adjuvant for Anthrax protective antigen enhances immunogenicity and provides single-immunization protection against inhaled anthrax in monkeys. *J Immunology* 2016; 196: 1: 284–297. DOI: 10.4049/jimmunol.1501903
100. Milley B., Kiwan R., Ott G.S., Calacsan C., Kachura M., Campbell J.D. et al. Optimization, production and characterization of a CpG–oligonucleotide–ficoll conjugate nanoparticle adjuvant for enhanced immunogenicity of anthrax protective antigen. *Bioconjugate Chemistry* 2016; 27: 5: 1293–1304. DOI: 10.1021/acs.bioconjug.6b00107
101. Wiersinga W.J., Currie B.J., Peacock S.J. Melioidosis. *The new england journal of medicine* 2012; 367: 1035–1044. DOI: 10.1056/NEJMr1204699
102. Илюхин В.И., Сенина Т.В. Мелиоидоз: итоги столетнего изучения, современные проблемы и зримые перспективы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. — 2012. — № 5. — С. 18–26. / Ilyukhin V.I., Senina T.V. Melioidoz: itogi stoletnego izucheniya, sovremennye problemy i zrimye perspektivy. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* 2012; 5: 18–26. [in Russian]
103. Estes D.M., Dow S.W., Schweizer H.P., Torres A.G. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2010; 8: 3: 325–338. DOI: 10.1586/eri.10.4
104. Judu B.M., Taylor K., Deeraksa A., Johnston R.K., Endsley J.J., Vijayakumar S. et al. Prophylactic application of CpG oligonucleotides augments the early host response and confers protection in acute melioidosis. *PLoS ONE* 2012; 7: 3: e34176. DOI: 10.1371/journal.pone.0034176
105. Easton A., Hague A., Chu K. et al. Lukaszewski R., Bancroft G.J. A critical role for neutrophils in resistance to experimental infection with *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Dis* 2007; 195: 1: 99–107. DOI: 10.1086/509810
106. Wongratanchaveevin S., Kespichayawattana W., Intachote P., Pichyangkul S., Sermiswan R.W., Krieg A.M. et al. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide confers protection in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity* 2004; 72: 8: 4494–44502. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4494-4502.2004
107. Nordly P., Madsen H.B., Nielsen H.M., Foged C. Status and future prospects of lipid-based particulate delivery systems as vaccine adjuvants and their combination with immunostimulators. *Exp Opin Drug Delivery* 2009; 6: 7: 657–672. DOI: 10.1517/17425240903018863
108. Neeland M.R., ElHay M.J., Meeusen E.N., de Veer M.J. Vaccination with liposomal poly(I: C) induces discordant maturation of migratory dendritic cell subsets and anti-viral gene signatures in afferent lymph cells. *Vaccine* 2014; 32: 47: 6183–6192. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.09.036
109. Puangpet A., Anderson R., Huang Y.Y., Sermiswan R.W., Chaicumpa W., Sirisinha S. et al. Cationic liposomes extend the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide against *Burkholderia pseudomallei* infection in BALB/c mice. *ClinVacc Immunol* 2012; 19: 5: 675–683. DOI: 10.1128/CI.05545-11
110. Aschenbroich S.A. DNA vaccination resurfaces in the struggle against melioidosis. *Virulence* 2017; 8: 8: 1483–1485. DOI: 10.1080/21505594.2017.1327499
111. Choh L.C., Ong G.H., Vellasamy K.M., Kalaiselvam K., Kang W.T., Al-Maleki A.R. et al. *Burkholderia* vaccines: are we moving forward? *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3: 5. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00005
112. Lankelma J.M., Wagemakers A., Birnie E., Haak B.W., Trentelman J.J.A., Weehuizen T.A.F. et al. Rapid DNA vaccination against *Burkholderia pseudomallei* flagellin by tattoo or intranasal application. *Virulence* 2017; 21: 1–12. DOI: 10.1080/21505594.2017.1307485

113. Chen Y.S., Hsiao Y.S., Lin H.H., Yen C.M., Chen S.C., Chen Y.L. Immunogenicity and anti-*Burkholderia pseudomallei* activity in Balb/c mice immunized with plasmid DNA encoding flagellin. *Vaccine* 2006; 24: 6: 750–758. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.069
114. Russel D.G., VanderVen B.C., Lee W., Abramovich R.B., M.J. Kim, Homolka S. et al. Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell Host & Microbe* 2010; 8: 1: 68–76. DOI: 10.1016/j.chom.2010.06.002
115. Ткачук А.П., Карягина А.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Перспективы создания вакцин для профилактики туберкулеза. Медицинский альянс. — 2013. — № 3. — С. 25–37. / Tkachuk A.P., Karyagina A.S., Logunov D.YU., Gintsburg A.L. Perspektivy sozdaniya vaksin dlya profilaktiki tuberkuleza. *Meditsinskij al'yans* 2013; 3: 25–37. [in Russian]
116. Стукова М.А., Заболотных Н.В., Виноградова Т.И., Гергерт В.Я., Анн А.С., Капрелянт А.С. и соавт. Профилактика туберкулеза: современные подходы к разработке противотуберкулезных вакцин. Вестник Российской академии медицинских наук. — 2012. — № 11. — С. 45–51. DOI: 10.15690/vramn.v67i11.471 / Stukova M.A., Zabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Gergert V.YA., Apt A.S., Kaprelyants A.S. i soavt. Profilaktika tuberkuleza: sovremennye podkhody k razrabotke protivotuberkuleznykh vaksin. *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk* 2012; 11: 45–51. DOI: 10.15690/vramn.v67i11.471 [in Russian]
117. Juffermans N.P., Leemans J.C., Florquin S., Verbon A., Kolk A.H., Speelman P. et al. CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infection and Immunity* 2002; 70: 1: 147–152. DOI: 10.1128/IAI.70.1.147–152.2002
118. Fonseca D.M., Siva C.L., Paula M.O., Soares E.G., Marchal G., Horn C. et al. Increased levels of interferon- γ primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 2007; 121: 4: 508–517. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02597.x
119. Fonseca D.M., Paula M.O., Wowk P.F., Campos L.W., Gembre A.F., Turato W.M. et al. IFN γ -mediated efficacy of allergen-free immunotherapy using mycobacterial antigens and CpG-ODN. *Immunol Cell Biol* 2011; 89: 777–785. DOI: 10.1038/icb.2011.9
120. Мордык А.В., Иванова О.Г., Нагибина Л.А., Ситникова С.В., Сагалбаева Г.Ж. и соавт. Применение иммунопрепарата в комплексном лечении деструктивного инфильтративного туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. — 2015. — № 10. — С. 69–75. / Mordyk A.V., Ivanova O.G., Nagibina L.A., Sitnikova S.V., Sagalbaeva G.ZH. i soavt. Primenenie immunopreparanta v kompleksnom lechenii destruktivnogo infiltrativnogo tuberkuleza. *Tuberkulez i bolezni legkih* 2015; 10: 69–75. [in Russian]
121. Sato T., Yamamoto M., Shimosato T., Klinman D.M. Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair and Regeneration* 2010; 18: 6: 586–593. DOI: 10.1111/j.1524–475X.2010.00632.x
122. Чубарян В.Т., Митченко Е.И., Мильчаков К.С. Деринат при туберкулезе. Анализ опыта применения. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2016. — № 1. — С. 57: 16–22. / Chubaryan V.T., Mitchenko E.I., Mil'chakov K.S. Derinat pri tuberkuleze. Analiz opyta primeneniya. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* 2016; 1: 57: 16–22. [in Russian]
123. Agger E.M., Rosenkrands I., Olsen A.W., Hatch G., Williams A., Kritsch C. et al. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B–ESAT–6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine* 2006; 24: 26: 5452–5460. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.03.072
124. Huang Y., Suyemoto M., Garner C. D., Cicconi K. M., Altier C. Formate acts as a diffusible signal to induce Salmonella invasion. *Bacteriology* 2008; 190: 12: 4233–4241. DOI: 10.1128/jb.00205–08
125. Ribes S., Meister T., Ott M., Redlich S., Janova H., Hanisch U.K. et al. Intraperitoneal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotides protects neutropenic mice against intracerebral *Escherichia coli* K1 infection. *Neuroinflammation* 2014; 11: 14–18. DOI: 10.1186/1742–2094–11–14
126. Rees D.G.C., Hartley M.G., Green M., Lukaszewskiet R.A., Griffinal K.F., Atkins H.S. et al. The ability of CpG oligodeoxynucleotides to protect mice against *Francisella tularensis* live vaccine strain but not fully virulent *F. tularensis* subspecies holarctica is reflected in cell-based assays. *Microbial Pathogenesis* 2013; 63: 16–18. DOI: 10.1016/j.micpath.2013.04.013
127. Al-Marri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godefroid J. et al. Protection of BALB/c mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infection and Immunity* 2001; 69: 8: 4816–4822. doi: 10.1128/IAI.69.8.4816–4822.2001
128. Селина О.Е., Белов С.Ю., Власова Н.Н., Балышева В.И., Чурун А.И., Бартоковик А. и соавт. Биодegradируемые микрокапсулы с включенной в них ДНК для создания новых ДНК-вакцин. Биоорганическая химия. — 2009. — Т. 36. — № 1. — С. 113–121. / Selina O.E., Belov S.YU., Vlasova N.N., Balysheva V.I., CHurin A.I., Bartkovik A. i soavt. Biodegradiruemye mikrokapsuly s vkluchennoy v nikh DNK dlya sozdaniya novykh DNK-vaksin. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2009; 36: 1: 113–121. [in Russian]
129. Asokanathan C., Corbel M., Xing D. A CpG-containing oligodeoxynucleotide adjuvant for acellular pertussis vaccine improves the protective response against Bordetella pertussis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2013; 9: 2: 325–331.
130. Maeyama J.I., Komiya T., Takahashi M., Isaka M., Goto N., Yamamoto S. The mucosal adjuvant activity of the oligonucleotides containing a non-methylated CpG motif on BCG and diphtheria toxoid. *Vaccine* 2009; 27: 1166–1173. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.12.025
131. Wang Y., Wang Y., Kang N., Liu Y., Shan W., Bi S. et al. Construction and immunological evaluation of CpG–Au@HBc virus-like nanoparticles as a potential vaccine. *Nanoscale Research Letters* 2016; 11: 338–342. DOI: 10.1186/s11671–016–1554–y
132. World Health Organization Hepatitis B. Hepatitis B (2002) [(accessed on 13 June 2016)]. Available online: .
133. Cutts F.T., Franceschi S., Goldie S., Castellsague X., de Sanjose S., Garnett G., et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: A review. *Bulletin of the World Health Organization* 2007; 85: 649–732. DOI: 10.2471/BLT.06.038414
134. Zhu F.C., Zhang J., Zhang X.F. Zhou C., Wang Z.Z., Huang S.J. et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale? Randomized, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 2010; 376: 9744: 895–902. DOI: 10.1016/S0140–6736(10)61030–6
135. Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet* 2015; 386: 9988: 31–45. DOI: 10.1016/S0140–6736(15)60721–8

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Беседнова Наталья Николаевна — академик РАН, д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Макаренкова Илона Дамировна — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Федянина Людмила Николаевна — д. м. н., профессор школы биомедицины ДВФУ, Владивосток

Авдеева Жанна Ильдаровна — д. м. н., профессор главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и

других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Крыжановский Сергей Петрович — д. м. н., заведующий кафедрой медицинской реабилитологии и спортивной медицины ТГМУ, Владивосток

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., заведующая лабораторией иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Школа биомедицины ДВФУ, Владивосток

Запорожец Татьяна Станиславовна — д. м. н., заместитель директора по научной работе «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

А-стрептококковые инфекции глотки: диагностика и рациональная антибактериальная терапия

Б. С. БЕЛОВ

НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва

Group A Streptococcal Pharyngeal Infections: Diagnosis and Rational Antibacterial Therapy

B. S. BELOV

V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow

Проблема острого тонзиллита, вызванного бета-гемолитическим стрептококком группы А (БГСА), по-прежнему сохраняет свою актуальность как во врачебном, так и в общемедицинском плане. В настоящей статье представлены данные, свидетельствующие о возрождении высоковирулентной БГСА-инфекции и нарастании частоты осложнений (острая ревматическая лихорадка, синдром токсического шока), обоснована необходимость рациональной антибактериальной терапии данной патологии. Препаратами выбора для лечения острых форм БГСА-тонзиллита являются пенициллины и цефалоспорины I поколения, а при непереносимости бета-лактамов — макролиды. При наличии хронического рецидивирующего БГСА-тонзиллита, когда вероятность колонизации очага инфекции микроорганизмами, продуцирующими бета-лактамазы, достаточно высока, применяют ингибиторозащищённые пенициллины или цефалоспорины II—III поколения. Антибиотики — линкозамиды используют в терапии острого и хронического БГСА-тонзиллита как препараты резерва.

Ключевые слова: А-стрептококковый тонзиллит, антибиотикотерапия, пенициллины, макролиды, линкозамиды.

The problem of acute tonsillitis caused by Group A Beta-Hemolytic *Streptococcus* (GABHS) still remains relevant. This article provides data showing the revival of highly virulent GABHS infection and an increase in the incidence of complications (acute rheumatic fever, toxic shock syndrome), and substantiates the need for rational antibiotic therapy of this pathology. The drugs of choice for the treatment of acute forms of GABHS tonsillitis are penicillins and cephalosporins of the first generation, and macrolides in case of intolerance to beta-lactam antibiotics. In the presence of chronic relapsing GABHS tonsillitis, when the probability of colonization of the source of infection by microorganisms producing beta-lactamases is high enough, inhibitor-protected penicillins or cephalosporins of II—III generation are used. Lincosamide antibiotics are used in the treatment of acute and chronic GABHS tonsillitis as reserve drugs.

Keywords: group A streptococcal tonsillitis, antibiotic therapy, penicillins, macrolides, lincosamides.

Введение

Инфекции верхних дыхательных путей относятся к числу заболеваний, широко распространённых в амбулаторной практике. При этом наиболее значимым бактериальным возбудителем является бета-гемолитический стрептококк группы А (БГСА). Общеизвестно, что БГСА-инфекции глотки могут привести к развитию ранних гнойных (абсцессы, флегмоны) и поздних иммуноопосредованных (острая ревматическая лихорадка — ОРЛ, постстрептококковый гломерулонефрит) осложнений, что может быть успешно предупреждено своевременным назначением адекватной антибактериальной терапии.

Чрезвычайная актуальность данной проблемы подчёркивается пристальным вниманием к

ней со стороны международных и национальных научных медицинских ассоциаций, эксперты которых периодически выпускают обновлённые варианты рекомендаций по диагностике и лечению БГСА-инфекций глотки [1—3].

Терминология

Следует отметить явное противоречие в отечественной и зарубежной нозологической терминологии.

Острый тонзиллит (ангина) — это воспаление одного или нескольких лимфоидных образований глоточного кольца, чаще нёбных миндалин, и имеющее, большей частью, стрептококковую, реже — вирусную этиологию. Под острым фарингитом понимают воспаление слизистой оболочки глотки преимущественно вирусного генеза. В соответствии с международной классификацией болезней X пересмотра выделяют стрептококковый фарингит (J02.0) и стрептококковый тонзил-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 115522 Москва, Каширское шоссе д. 34А. НИИ ревматологии

лит (J03.0). Однако в зарубежной литературе широко используются взаимозаменяемые термины «тонзиллофарингит» и «фарингит». Такое смешивание понятий, которое в последние годы стало встречаться, к сожалению, и в отечественной медицинской литературе, представляется, на наш взгляд, не совсем корректным с учётом различий в этиопатогенезе и патоморфологии, а также в практических подходах к терапии. Отчасти можно согласиться с термином «тонзиллофарингит», имея в виду возможное сочетание симптоматики тонзиллита и фарингита, особенно в педиатрической практике. Однако говорить о поражении миндалин (нередко — гнойном), протекающем в рамках состояния, которое диагностируется как «фарингит» (?), представляется абсурдным с точки зрения русскоязычной терминологии. Кроме того, широкое применение термина «фарингит» (который, как указывалось выше, ассоциируется преимущественно с вирусной инфекцией) может повлечь за собой необоснованный отказ от применения антибиотиков в тех клинических ситуациях, где эти препараты необходимы. Поэтому в отечественных практических рекомендациях указанные два термина разделены между собой (тонзиллит/фарингит) [4].

Эпидемиология

БГСА передается воздушно-капельным путём. Источниками инфекции являются больные и, реже, бессимптомные носители. Наибольшая заболеваемость отмечается в зимне-весенний период. Характерно быстрое распространение инфекции (особенно — в организованных коллективах с пребыванием людей в стеснённых условиях), а также преимущественное поражение детей в возрасте 5—15 лет и молодых лиц.

Точных данных официальной статистики по БГСА-инфекциям нет. Однако, согласно результатам американских исследователей, практически каждый ребенок, достигший 5-летнего возраста, имеет в анамнезе перенесённую БГСА-инфекцию глотки, а в возрасте 13 лет количество эпизодов заболевания достигает трёх [5]. При этом прямые и косвенные расходы, связанные с каждым случаем БГСА-тонзиллита/фарингита, составляют 205 долларов. При экстраполяции на все население США указанная стоимость колеблется от 224 млн до 539 млн долларов ежегодно [6].

Вся имеющаяся на сегодня информация свидетельствует о том, что, по крайней мере, в пределах нескольких следующих десятилетий человечество не сможет быть избавлено от стрептококка этой группы. Более того, проведённый В. Д. Беляковым [7] анализ эпидемиологического процесса показал, что в конце XX века появилась и нарастает БГСА-инфекция, являющаяся аналогом таковой прошлых времен. И в ближайшем бу-

дущем всем нам предстоит решающее сражение с высоковирулентной агрессивной БГСА-инфекцией, которая в соответствии с её биологическими характеристиками способна проявить такую же мощь, как и в начале XX века.

Данное положение уже нашло своё подтверждение. В середине 1980-х годов в США, стране, имевшей наиболее благоприятные медико-статистические показатели, разразилась вспышка ОРЛ среди детей и молодых взрослых. Причём в большинстве случаев заболевали дети из семей, годовой достаток в которых превышал средний по стране (т.е. отдельное жильё, полноценное питание, возможность своевременного получения квалифицированной медицинской помощи). Среди наиболее вероятных причин данной вспышки далеко не последнюю роль сыграл и так называемый врачебный фактор. Как оказалось, многие молодые врачи никогда не видели больных с ОРЛ, не предполагали возможности циркуляции стрептококка в школьных коллективах, не знали о профилактическом значении пенициллина и часто вообще не имели представления о том, что при БГСА-тонзиллитах/фарингитах нужно применять антибиотики.

В конце 1980 начале 1990 годов из США и ряда стран Западной Европы стали поступать сообщения о чрезвычайно тяжёлой инвазивной БГСА-инфекции, протекающей с гипотензией, коагулопатией и полиорганной недостаточностью. Для обозначения этого состояния был предложен термин «синдром стрептококкового токсического шока» (streptococcal toxic shock-like syndrome) по аналогии со стафилококковым токсическим шоком. И хотя основными «входными воротами» для этой угрожающей жизни инфекции служили кожа и мягкие ткани, в 10—20% случаев заболевание ассоциировалось с первичным очагом, локализующимся в лимфоидных структурах носоглотки. Более того, при анализе инвазивных БГСА-инфекций в США в 1985—1992 гг. установлено, что кривые заболеваемости ОРЛ и синдромом токсического шока стрептококкового генеза были очень схожими как по времени, так и по амплитуде.

Дополнительным подтверждением изложенному служат недавние вспышки ОРЛ в трёх регионах Италии, Израиле, Словении [8—10], а также чрезвычайно высокие показатели заболеваемости данной нозологической формой в Австралии и Океании [11].

Клинические проявления

Выделяют эпидемиологические и клинические признаки, в большей степени присущие БГСА-инфекции глотки или вирусному фарингиту (табл. 1). Однако наибольшее значение в разграничении БГСА-тонзиллита с другими нозология-

Таблица 1. Эпидемиологические и клинические признаки БГСА-инфекции глотки и вирусного фарингита

БГСА-тонзиллит/фарингит	Вирусный фарингит
• острая боль в горле • возраст 5—15 лет • лихорадка • головная боль • тошнота, рвота, боль в животе (чаще у детей) • гиперемия и отёк миндалин и задней стенки глотки • наличие экссудата в криптах миндалин • петехии на мягком небе • увеличение и болезненность шейных лимфоузлов	• конъюнктивит • ринит • кашель • диарея • охриплость голоса • очаговый язвенный стоматит • вирусная экзантема

Таблица 2. Шкала McIsaac для диагностики БГСА-тонзиллита/фарингита [12, в модификации]

Критерий	Оценка, баллы
Лихорадка $\geq 38^\circ$	1
Отсутствие кашля	1
Увеличение и болезненность подчелюстных лимфоузлов	1
Отёчность миндалин и наличие экссудата	1
Возраст	
Моложе 15 лет	1
15—45 лет	0
Старше 45 лет	-1

Примечание. Алгоритм назначения антибактериальной терапии (АБТ) при отсутствии условий для микробиологического исследования: 0—1 балл — АБТ не показана; 2 балла — АБТ по усмотрению врача; 3—5 баллов — АБТ.

ми имеют лихорадка $\geq 38^\circ$, отсутствие кашля, отёчность миндалин и наличие в них экссудата, увеличение и болезненность подчелюстных лимфоузлов. Эти симптомы составляют основу предложенного R. Centor и модифицированного W. McIsaac клинического алгоритма, который был апробирован на большой группе пациентов (табл. 2). Данный алгоритм позволяет при первом осмотре больного предположить наличие БГСА-инфекции глотки и, соответственно, решить вопрос о назначении эмпирической антимикробной терапии при невозможности дальнейшей этиологической верификации диагноза.

Диагностика

Диагноз БГСА-тонзиллита/фарингита следует подтверждать микробиологическим исследованием мазка с поверхности миндалин и/или задней стенки глотки. Однако у культурального метода имеется ряд недостатков:

- а) он не позволяет дифференцировать активную инфекцию от БГСА-носительства;
- б) для выполнения данного исследования требуется 2—3 суток;
- в) необходимо наличие сертифицированной микробиологической лаборатории и решение ряда организационных вопросов (доставка образцов, наличие персонала, обеспечение транспортом и др.);
- г) высокая стоимость исследования.

В последние годы всё большее распространение получают тестовые системы, основанные на иммунохроматографическом методе. Они позволяют определять БГСА-антиген в течение 5—7 мин и обладают высокой специфичностью и чувствительностью. В России подобный экспресс-тест

(Стрептатест) зарегистрирован в 2010 г. Результаты маркетинговых исследований свидетельствуют о необходимости более активного внедрения этого теста в широкую клиническую практику.

Определение титров противострептококковых антител, в частности антистрептолизина-О (АСЛ-О), при обследовании больного с текущей БГСА-инфекцией глотки является малоинформативным. Повышение титров АСЛ-О начинается к концу 2-й недели и достигает максимума к 4—5-й неделе от начала болезни, т.е. в период, когда клиническая симптоматика БГСА-тонзиллита/фарингита практически полностью регрессирует. Также следует заметить, что нормальные значения вышеуказанного показателя варьируют в зависимости от возраста больного, географического положения местности и сезона. Поэтому, в соответствии рекомендациями ВОЗ, верхняя граница нормы для противострептококковых антител не должна превышать 20% уровень над популяционными данными, полученными от здоровых лиц определённой возрастной группы, проживающих в конкретном регионе с учётом времени года. Необходимо, чтобы для каждой серии новых исследований в качестве контроля использовали стандартизованные сыворотки с известным титром противострептококковых антител.

Следует отметить, что повышение титров АСЛ-О отражает только контакт макроорганизма с БГСА-инфекцией и отнюдь не является признаком активного ревматического процесса. Указанный феномен, выявленный однократно во время диспансеризации у здоровых лиц, не рассматривается в качестве показателя к антибактериальной терапии. Кроме того, повышенные титры АСЛ-О могут наблюдаться при инфекциях, вызванных

Таблица 3. Дозы и режим введения антибиотиков при остром БГСА-тонзиллите [4]

Антибиотики	Суточная доза (кратность)		Длительность, дни
	взрослые	дети	
Пенициллины			
Бензатин-пенициллин	2,4 млн ЕД.	1,2 млн ЕД.	однократно
Феноксиметилпенициллин ¹⁾	1,5 г (3)	0,75 г (3)	10
Амоксициллин	1,5 г (3)	50 мг/кг (3)	10
Цефалоспорины			
Цефадроксил	1 г (2)	30 мг/кг (1—2)	10
При непереносимости бета-лактамных антибиотиков			
Макролиды			
Спирамицин	6 млн ЕД (2)	3 млн ЕД (2)	10
Азитромицин	0,5 г — 1-й день, затем 0,25 г (1) ²⁾	12 мг/кг (1) ²⁾	5
Рокситромицин	0,3 г (2)	5 мг/кг (2)	10
Кларитромицин	0,5 г (2)	15 мг/кг (2)	10
Мидекамицин	1,2 г (3)	50 мг/кг (3)	10
Джозамицин	1,5 г (3)	40—50 мг/кг (3)	10
Эритромицин ³⁾	1,5 г (3)	40 мг/кг (3)	10
При непереносимости макролидов и бета-лактамных антибиотиков			
Линкозамиды			
Линкомицин	1,5 г (3)	30 мг/кг (3)	10
Клиндамицин	0,6 г (4)	20 мг/кг (3)	10

Примечание. ¹⁾ Рекомендуется, преимущественно, для лечения детей, учитывая наличие лекарственной формы в виде суспензии. ²⁾ Схемы одобрены FDA. ³⁾ Для эритромицина характерно наиболее частое, по сравнению с другими макролидами, развитие побочных реакций, особенно со стороны желудочно-кишечного тракта.

стрептококками из групп С или G, которые никакого отношения к ОРЛ не имеют.

Антибактериальная терапия

Учитывая возможность спонтанного купирования клинической симптоматики БГСА-тонзиллита и выздоровления без каких-либо осложнений, некоторые врачи при курации таких больных совершенно необоснованно отдают предпочтение местному лечению (полоскание, ингаляции и т.д.) в ущерб системной антибиотикотерапии. Подобный подход представляется совершенно неправильным и даже вредным для больного из-за угрозы развития вышеуказанных весьма серьезных последствий.

На сегодняшний день истинные причины упомянутого «возрождения» высоковирулентной БГСА-инфекции остаются полностью не раскрытыми. В связи с этим точный диагноз и обязательная рациональная антибиотикотерапия БГСА-тонзиллита (в том числе, его малосимптомных форм) стали играть ещё более важную роль как в контроле за распространением этих инфекций, так и в профилактике осложнений.

Основными принципами для выбора антибиотика при БГСА-инфекции глотки являются следующие: эффективность, безопасность, антимикробный спектр (узкий или широкий), режим дозирования, комплаентность (соблюдение предписанной схемы терапии) и стоимость.

С учётом вышеизложенного, пенициллин V (феноксиметилпенициллин) или амоксициллин рассматриваются как средства выбора при остром БГСА-тонзиллите/фарингите у больных с хорошей переносимостью этих препаратов (табл. 3). Опти-

мальным препаратом из группы оральных пенициллинов представляется амоксициллин, который по противострептококковой активности аналогичен ампициллину и феноксиметилпенициллину, но существенно превосходит их по своим фармакокинетическим характеристикам, отличаясь большей биодоступностью (95, 40 и 50%, соответственно) и меньшей степенью связывания с сывороточными белками (17, 22 и 80%, соответственно).

Ранее [1, 2] была предложена новая схема применения амоксициллина, заключающаяся в однократном приёме суточной дозы, составляющей 50 мг/кг, максимум 1 г, в течение 10 дней. Основанием для внедрения указанной схемы послужили результаты 4 сравнительных исследований, в ходе которых было показано, что клиническая и бактериологическая активность амоксициллина, назначавшегося 1 раз в сутки больным с БГСА-инфекцией глотки, была сопоставима с таковой в группах сравнения. В то же время эти работы различались как по суточным дозам амоксициллина в исследуемых группах, так и по схемам лечения в контроле. Более того, подобные схемы восприняты отнюдь не однозначно, в частности, европейскими авторами, и не одобрены контролирующими органами (FDA, EMA) для первичной профилактики ОРЛ [13,14].

Назначение ампициллина в пероральной форме для лечения БГСА-тонзиллита, а также инфекций дыхательных путей иной локализации в настоящее время большинством авторов признано нецелесообразным по причине неудовлетворительных фармакокинетических характеристик препарата (в первую очередь — низкой биодоступности).

Применение феноксиметилпенициллина представляется оправданным только у младшего контингента больных, учитывая наличие лекарственной формы в виде суспензии, а также несколько большую комплаентность, контролируемую со стороны родителей, чего нельзя сказать о подростках. Кроме того, хотелось бы напомнить о специфическом феномене аминопенициллин-ассоциированной кожной сыпи у больных инфекционным мононуклеозом, частота развития которой в современных условиях составляет 29,5% [15]. Поэтому феноксиметилпенициллин рассматривается как препарат выбора в ситуациях, когда у пациента с острым тонзиллитом невозможно быстро исключить диагноз инфекционного мононуклеоза по имеющимся клиническим и лабораторным признакам, а также провести микробиологическое исследование или экспресс-тест на БГСА.

Назначение однократной инъекции бензатин-пенициллина целесообразно в следующих случаях:

- а) низкая исполнительность больных;
- б) ОРЛ и/или хроническая ревматическая болезнь сердца (ХРБС) в анамнезе у ближайших родственников;
- в) неблагоприятные социально-бытовые условия (фактор скученности);
- г) вспышки БГСА-инфекции в организованных коллективах;
- д) невозможность перорального приёма.

Наряду с пенициллинами заслуживает несомненного внимания представитель оральных цефалоспоринов I поколения цефадроксил, высокая эффективность которого в терапии А-стрептококковых тонзиллитов, а также хорошая переносимость подтверждены в многочисленных клинических исследованиях. Следует помнить, что среди пациентов с непереносимостью пенициллина перекрестные аллергические реакции на цефалоспорины встречаются в 10–15% случаев.

При непереносимости бета-лактамов антибиотиков целесообразно назначение макролидов, противострептококковая активность которых сопоставима с таковой для пенициллина. Эти препараты также обладают способностью создавать высокую тканевую концентрацию в очаге инфекции и хорошей переносимостью. Применение эритромицина — первого представителя антибиотиков данного класса в настоящее время существенно снизилось, особенно — в терапевтической практике, поскольку он наиболее часто, по сравнению с другими макролидами, вызывает нежелательные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта, обусловленные его стимулирующим действием на моторику желудка и кишечника.

Длительность лечения БГСА-инфекции глотки макролидами составляет 10 дней, для азитро-

мицина — 5 дней. Следует отметить, что ранее одобренная Фармкомитетом РФ схема применения (10 мг/кг/сут в 1 приём в течение 3 дней, курсовая доза 30 мг/кг) значительно уступает по бактериологической эффективности как 5-дневной схеме (12 мг/кг/сут в 1 приём в течение 5 дней, курсовая доза 60 мг/кг), так и препаратам сравнения [16, 17].

Антибиотики — линкозамиды (линкомицин, клиндамицин) также обладают высокой противострептококковой активностью, но их назначают при БГСА-тонзиллите только при непереносимости как бета-лактамов, так и макролидов.

У больных с хроническим рецидивирующим тонзиллитом следует учитывать высокую вероятность локализуемой в глубоких слоях миндалин ко-патогенной флоры (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*), способной продуцировать бета-лактамазы. Данное обстоятельство рассматривается как одна из причин неудач пенициллинотерапии у этих пациентов. Как свидетельствуют данные недавно опубликованного систематического обзора, амоксициллин/клавуланат и клиндамицин превосходили пенициллин как по микробиологической эффективности, так и по снижению частоты рецидивов данного заболевания [18]. Схемы антимикробной терапии хронического рецидивирующего А-стрептококкового тонзиллита, принятые в РФ, представлены в табл. 4.

Необходимо отметить, что применение тетрациклинов, сульфаниламидов и ко-тримоксазола (бисептола) при БГСА-инфекции глотки в настоящее время не оправдано по причине высокой частоты резистентности и, следовательно, низких показателях эффективности терапии. Назначение ранних фторхинолонов (ципрофлоксацин, пефлоксацин, офлоксацин, ломефлоксацин) не обосновано вследствие низкой природной противострептококковой активности этих препаратов. Фторхинолоны II поколения, (т.н. «респираторные» — левофлоксацин, моксифлоксацин), несмотря на их высокую противострептококковую активность, не показаны для стандартного лечения БГСА-инфекций глотки из-за широкого спектра антимикробного действия (что может послужить побудительным моментом к формированию резистентности к этим препаратам со стороны других возбудителей инфекций), менее благоприятного (по сравнению с пенициллином) профиля нежелательных лекарственных реакций, а также более высокой стоимости.

Интернализация и биоплёнки при БГСА-инфекциях глотки

В рамках рассматриваемой проблемы указанные микробиологические феномены в последнее время приобретают всё большую популярность (иногда — искусственно гипертрофированную). Следует отметить, что при сдержанной оценке

Таблица 4. Дозы и режим введения антибиотиков при хроническом рецидивирующем БГСА-тонзиллите [4]

Антибиотики	Суточная доза (кратность)		Длительность лечения, дни
	взрослые	дети	
Амоксициллин/клавуланат	1,875 г (3)	40 мг/кг (3)	10
Цефуроксим-аксетил	0,5 г (2)	20 мг/кг (2)	10
Цефиксим	0,4 г (1)	8 мг/кг (1)	10
Клиндамицин	0,6 г (4)	20 мг/кг (3)	10
Линкомицин	1,5 г (3)	30 мг/кг (3)	10

клинической значимости полученных данных со стороны микробиологов, рядом авторов (к сожалению, недостаточно обоснованно и, что крайне важно, без оценки последствий!!) предлагается пересмотреть ныне существующие схемы анти-микробной терапии и назначать макролиды как препараты первого ряда при хронических формах БГСА-тонзиллитов/ фарингитов.

Суть феномена интернализации состоит в том, что БГСА, являющиеся внеклеточными патогенами, могут проникать внутрь эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей и таким образом быть защищёнными от действия бета-лактамов антибиотиков. Однако, по данным эксперта ВОЗ по проблемам стрептококковых инфекций проф. Э.Каплана, указанный феномен аналогичен таковому, наблюдаемому у носителей БГСА в верхних дыхательных путях. Подходы к терапии таких пациентов указаны ниже.

В то же время, как подчёркивает проф. Э.Каплан, феномен интернализации «не следует интерпретировать как указание на то, что макролиды или азалиды являются более эффективными в эрадикации БГСА из верхних дыхательных путей. Врачам следует иметь в виду, что локальные показатели устойчивости БГСА к макролидам остаются достаточно значимыми во многих регионах, особенно за пределами США» [19].

По вопросу микробных биоплёнок можно сказать следующее. Недавно был опубликован обзор германских исследователей, в котором подчёркивается, что в силу нарастающей устойчивости БГСА к макролидам последние не являются решением проблемы А-стрептококковых биоплёнок [20]. Гораздо более перспективным направлением исследований в этой области представляется совместное применение общепринятых терапевтических схем (пенициллины) и кодируемых бактериофагами специфических ферментов — пептидогликангидролаз (эндолизин), способных разрушать как экзополимерный матрикс биоплёнки, так и клеточную стенку БГСА [21]. К тому же до настоящего времени сравнительные рандомизированные контролируемые исследования, демонстрирующие клиническую и бактериологическую эффективность макролидов и азалидов при хронических рецидивирующих БГСА-тонзиллитах/фарингитах, ассоциированных с формированием биоплёнок, не проводились. Следовательно, дозы и схемы применения этих препара-

тов для подобных больных не разработаны. Поэтому необходимы дальнейшие исследования в данном направлении, которые позволят оценить эффективность подобной тактики и потенциальные риски её применения, как для отдельного пациента (безопасность и переносимость), так и для общества в целом (развитие антибиотикорезистентности) [22].

Необходимо отметить, что на рубеже XX—XXI веков приобретённая устойчивость БГСА к эритромицину была распространена достаточно высоко и в ряде стран Европы превышала 20%. Исследования, выполненные в Финляндии, Испании, Италии, Германии, Бельгии, подтвердили, что эта устойчивость, как правило, ассоциируется с потреблением макролидов и является управляемым процессом. Ограничение применения макролидов привело к 2—4-кратному снижению уровня резистентности БГСА к этим препаратам.

По данным многоцентрового проспективного исследования ПЕГАС-3, в России за период 2006—2009 гг. резистентность БГСА к макролидам была следующей: эритромицин — 0,8%, кларитромицин — 3,3%, азитромицин — 10%, спирамицин — 1,4%, джозамицин — 1,7%, мидекамицин — 4,1% [23]. Однако эти данные отнюдь не являются поводом для применения макролидов в качестве препаратов выбора для лечения БГСА-инфекций глотки.

Как указывалось выше, препаратами первого ряда в терапии БГСА-тонзиллитов/фарингитов являются бета-лактамы антибиотиков (в первую очередь, пенициллины). В условиях нарастающей резистентности БГСА к макролидам последние необходимо рассматривать лишь как альтернативные средства для лечения А-стрептококкового тонзиллита и назначать их только больным с аллергией на бета-лактамы. Несоблюдение данного требования, т.е. широкое применение макролидов в качестве стартовой эмпирической терапии БГСА-инфекции глотки может повлечь за собой весьма серьёзные последствия вплоть до развития ОРЛ [24]. Поэтому, перефразируя известного политика, не следует создавать самим себе трудности, чтобы потом их героически преодолевать.

Таким образом, феномены интернализации и биоплёнок не являются достаточным основанием для позиционирования макролидов в качестве препаратов первого ряда в терапии хронических БГСА-инфекций глотки.

БГСА-носительство

В условиях умеренного климата в зимне-весенний период около 20% детей школьного возраста могут быть бессимптомными носителями глоточной БГСА-инфекции. При этом на фоне БГСА-колонизации (которая может длиться ≥ 6 мес.), возможно развитие интеркуррентного вирусного фарингита. При обследовании таких больных выявляются доказательства присутствия БГСА в зеве (культуральный метод или экспресс-тест), что в совокупности с клиническими данными может привести к ошибочной диагностике А-стрептококкового тонзиллита/фарингита. Необходимо подчеркнуть, что при длительном наблюдении за БГСА-носителями признаки активного иммунного ответа макроорганизма в виде повышения титров АСЛ-О или анти-ДНК-азы В не выявляются. Полагают, что риск развития гнойных, инвазивных и негнойных осложнений (в частности, ОРЛ) у БГСА-носителей очень низкий или отсутствует.

В большинстве случаев БГСА-носительства антибактериальная терапия не показана. Однако существуют особые ситуации, при которых назначение антибиотиков оправдано:

- 1) в период вспышки ОРЛ, постстрептококкового гломерулонефрита или инвазивных БГСА-инфекций в данном регионе;
- 2) во время вспышки БГСА-тонзиллита/фарингита в закрытых и полужакрытых коллективах (воинские части, интернаты и т.п.);
- 3) при наличии ОРЛ в анамнезе у пациента или ближайших родственников;
- 4) в семье, члены которой излишне обеспокоены в отношении БГСА-инфекции;
- 5) при определении показаний к тонзилэктомии по причине БГСА-носительства. В указанных случаях целесообразны 10-дневные курсы лечения амоксициллин/клавуланатом или клиндамицином.

Роль бактериофагов в терапии БГСА-инфекций глотки

Терапия фагами в целом представляется, несомненно, перспективной, в первую очередь, из-за нарастания устойчивости возбудителей ряда инфекций к антибиотикам. Однако широкое применение этих препаратов и, в частности, стрептококкового фага в настоящее время ограничено в силу следующих обстоятельств.

- 1) Необходимое условие эффективной фаготерапии — это предварительное определение фагочувствительности возбудителя (выделение от больных штаммов стрептококков, чувствительных к стрептококковому бактериофагу). Отсюда следует необходимость наличия сертифицированной микробиологической лаборатории, способной быстро (!) выполнить настоящее исследование.

- 2) Стрептококковый бактериофаг выпускается в жидкой лекарственной форме. В связи с этим при пероральном приёме происходит частичная инактивация препарата кислой средой желудка. При местном применении в виде ватных тампонов, смоченных раствором фага и накладываемых на область миндалин, помимо неудобств для больного, возможно тампонирующее дыхание дыхательных путей (особенно у детей) с развитием асфиксии. Применение препарата в виде ингаляций или орошений как единственного метода лечения ангины представляется малоэффективным, поскольку лекарство быстро смывается слюной при глотании.

- 3) Не разработаны схемы, дозы и длительность лечения стрептококковыми фагами. Какие-либо методические рекомендации по этому поводу отсутствуют, вероятно, в силу того, что сравнительные контролируемые исследования не проводились. В инструкции по применению препарата вся информация по этому поводу ограничивается сроком лечения — 7–20 дней.

Таким образом, применение стрептококкового фага при БГСА-инфекциях глотки не возбраняется, но обязательно вместе с системной антибиотикотерапией (но не вместо последней!!).

Направления будущих исследований

Будущие исследования, по мнению экспертов IDSA, должны быть направлены на: а) совершенствование методов диагностики БГСА-тонзиллита/фарингита с дифференцировкой остро протекающей инфекции и хронического носительства, б) разработку более простых и коротких (но не в ущерб эффективности!!) схем лечения упомянутых инфекций, в) разработку доступной и безопасной БГСА-вакцины, эффективной в отношении большинства А-стрептококковых штаммов.

Вместе с тем на сегодняшний день готовность к активному внедрению БГСА-вакцины представляется достаточно низкой. Так, в ходе опроса, проведённого американскими исследователями среди педиатров, оказалось, что при отсутствии согласия со стороны родителей БГСА-вакцинацию рекомендовали лишь 40% респондентов [25].

Более того, несмотря на многочисленные исследования, некоторые авторы полагают, что «подход к разработке вакцины с применением М-протеина не обеспечил необходимого прорыва в течение последних 40 лет». Поэтому наиболее перспективным путём для создания БГСА-вакцины представляется идентификация новых общих для всех штаммов А-стрептококковых компонентов, обладающих иммунореактивными свойствами. Этими компонентами предположительно могут быть иные белки клеточной стенки стрептококка, гликопротеины, полисахариды и т. д. [26].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gerber M.A., Baltimore R.S., Eaton C.B., Gewitz M., Rowley A.H., Shulman S.T., Tauber K.A. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute Streptococcal pharyngitis: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2009; 119 (11): 1541–1551.
2. Shulman S.T., Bisno A.L., Clegg H.W., Gerber M.A., Kaplan E.L., Lee G. et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2012; 55 (10): e86–102.
3. Long A., Lungu J.C., Machila E., Schwaninger S., Spector J., Tadmor B. et al. A programme to increase appropriate usage of benzathine penicillin for management of streptococcal pharyngitis and rheumatic heart disease in Zambia. *Cardiovasc J Afr* 2017; 28 (4): 242–247.
4. Насонова В.А., Белов Б.С., Стречунский Л.С., Каманин Е.И., Богданович Т.М., Судилова Н.Н., Кречикова О.И., Богомилский М.Р., Овчинников Ю.М. Антибактериальная терапия стрептококкового тонзиллита и фарингита. *Клин. микробиол. антимикроб. тер.* — 1999. — № 1. — С. 78–82. / Nasonova V.A., Belov B.S., Strachunskij L.S., Kamanin E.I., Bogdanovich T.M., Sudilovskaya N.N., Krechikova O.I., Bogomil'skij M.R., Ovchinnikov Yu.M. Antibakterial'naya terapiya streptokokkovogo tonsillita i faringita. *Klin mikrobiol antimikrob ter* 1999; 1; 78–82. [in Russian]
5. Wannamaker L.W. Perplexity and precision in the diagnosis of streptococcal pharyngitis. *Am J Dis Child* 1972; 124: 352–358.
6. Pfoh E., Wessels M.R., Goldmann D., Lee G.M. Burden and economic cost of group A streptococcal pharyngitis. *Pediatrics* 2008; 121 (2): 229–234.
7. Беляков В.Д. Сюрпризы стрептококковой инфекции. *Вестн. РАМН.* — 1996. — № 11. — С. 24–28. / Belyakov V.D. Syurprizy streptokokkovoj infektsii. *Vestn. RAMN*, 1996; 11: 24–28. [in Russian]
8. Breda L., Miulli E., Marzetti V., Chiarelli F., Marcovecchio M.L. Rheumatic fever: a disease still to be kept in mind. *Rheumatology (Oxford)* 2013 May; 52 (5): 953.
9. Vinker S., Zohar E., Hoffman R., Elhayany A. Incidence and clinical manifestations of rheumatic fever: a 6 year community-based survey. *Isr Med Assoc J* 2010; 12 (2): 78–81.
10. Kočevar U., Toplak N., Kosmač B., Kopač L., Vesel S., Krajnc N. et al. Acute rheumatic fever outbreak in southern central European country. *Eur J Pediatr* 2017 Jan; 176 (1): 23–29.
11. Noonan S., Zuryski Y.A., Currie B.J., McDonald M., Wheaton G., Nissen M. et al. A national prospective surveillance study of acute rheumatic fever in Australian children. *Pediatr Infect Dis J* 2013 Jan; 32 (1): e26–32.
12. McIsaac W.J., Goel V., To T., Low D.E. The validity of a sore throat score in family practice. *CMAJ* 2000; 163 (7): 811–815.
13. Regoli M., Chiappini E., Bonsignori F., Galli L., de Martino M. Update on the management of acute pharyngitis in children. *Ital J Pediatr* 2011 Jan 31; 37: 10.
14. Chiappini E., Regoli M., Bonsignori F., Sollai S., Parretti A., Galli L., de Martino M. Analysis of different recommendations from international guidelines for the management of acute pharyngitis in adults and children. *Clin Ther* 2011; 33 (1): 48–58.
15. Chovel-Sella A., Ben Tov A., Lahav E., Mor O., Rudich H., Paret G., Reif S. Incidence of rash after amoxicillin treatment in children with infectious mononucleosis. *Pediatrics* 2013; 131 (5): e1424–427.
16. Casey J.R., Pichichero M.E. Higher dosages of azithromycin are more effective in treatment of group A streptococcal tonsillopharyngitis. *Clin Infect Dis* 2005; 40 (12): 1748–1755.
17. Altamimi S., Khalil A., Khalawi K.A., Milner R., Pusic M.V., Al Othman M.A. Short versus standard duration antibiotic therapy for acute streptococcal pharyngitis in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 1: CD004872.
18. Munck H., Jorgensen A.W., Klug T.E. Antibiotics for recurrent acute pharyngo-tonsillitis: systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018 Apr 13. doi: 10.1007/s10096-018-3245-3.
19. Kaplan E.L., Chhatwal G.S., Rohde M. Reduced ability of penicillin to eradicate ingested group A streptococci from epithelial cells: clinical and pathogenetic implications. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (11): 1398–1406.
20. Fiedler T., Köller T., Kreikemeyer B. *Streptococcus pyogenes* biofilms — formation, biology, and clinical relevance. *Front Cell Infect Microbiol* Published online: 11 February 2015.
21. Shen Y., Köller T., Kreikemeyer B., Nelson D.C. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68 (8): 1818–1824.
22. Азитромицин и биоплёнки. Данные на сайте: www.antibiotic.ru/forum.php? t=930 / Azitromitsin i bioplyonki. Dannye na sajte: www.antibiotic.ru/forum.php? t=930
23. Азовская О.В., Иванчик Н.В., Дехнич А.В., Кречикова О.И., Козлов Р.С., исследовательская группа «ПЕГАС». Динамика антибиотикорезистентности респираторных штаммов *Streptococcus pyogenes* в России за период 1999–2009 гг. *Клин микробиол антимикроб химиотер.* — 2012. — Т. 14. — № 4. — С. 309–321. / Azovskaya O.V., Ivanchik N.V., Dekhnich A.V., Krechikova O.I., Kozlov R.S., issledovatel'skaya gruppy «PeGAS». Dinamika antibiotikorezistentnosti respiratornykh shtammov *Streptococcus pyogenes* v Rossii za period 1999–2009 gg. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2012; 14 (4): 309–321. [In Russian]
24. Logan L.K., McAuley J.B., Shulman S.T. Macrolide treatment failure in streptococcal pharyngitis resulting in acute rheumatic fever. *Pediatrics* 2012; 129 (3): e798–802.
25. Gerber M.A., Brown H.W., Lee G., Tanz R.R., Temte J.L., Van Beneden C.A. Physicians' opinions about critical attributes of a potential group A streptococcal vaccine. *Vaccine* 2010; 28 (44): 7155–7160.
26. Tandon R. Preventing rheumatic fever: M-protein based vaccine. *Indian Heart J.* 2014 Jan-Feb; 66 (1): 64–67.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Белов Борис Сергеевич — д. м. н., зав. лабораторией изучения роли инфекций при ревматических заболеваниях, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

Редакция обращает внимание авторов на следующие правила и форму представления рукописей для публикации в журнале «Антибиотики и химиотерапия».

1. Рукописи статей в 2 экз. (вместе с электронной версией текста на диске) с приложением в 2 экз. иллюстраций (в отдельном конверте) направляются по адресу: **113105 Москва, ул. Нагатинская, д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия».** Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами **с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон).**

2. В выходных данных статьи указываются: название, инициалы, фамилии авторов, наименование учреждений, всех авторов, их должности, e-mail.

3. Статья печатается на одной стороне стандартного листа **через 1,5–2 интервала при ширине полей слева 3 см.**

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 60 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

5. Оригинальная статья должна включать (по порядку) следующие основные разделы: **«Резюме»** — не более 1 страницы; введение с кратким обзором литературы и постановкой цели исследования; **«Материал и методы»** — с детальным описанием объектов исследований, методических приёмов и квалификаций использованных реагентов (фирм-изготовителей); **«Результаты исследований»** и **«Обсуждение результатов»** или **«Результаты и обсуждение»**, **«Заключение»** или **«Выводы»** (по пунктам); **«Литература»** — с указанием цитируемых источников.

6. Таблицы должны быть пронумерованы, **иметь название**, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте. Необщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть **сноски.**

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. На обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. **Подписи к рисункам делаются на отдельном листе** с указанием номера рисунка и его названия. Для графиков и диаграмм отмечается, **что дано по осям координат** на приведенных кривых и т. п.

8. В формулах должны быть чётко **размечены все элементы:** строчные (м) и прописные (М) буквы, синим подчеркнуты латинские буквы, красным — греческие (с вынесением разметки на поля), четко выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, О — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

9. **Сокращения слов, названий** (кроме общепринятых сокращений мер физических, химических, а также математических величин и терминов) **не допускаются.** Меры даются по Международной системе единиц (**СИ**) в русском обозначении, температура по шкале Цельсия.

10. Латинские названия микроорганизмов приводятся в соответствии с современной классификацией. При первом упоминании название микроорганизма дается полностью — род и вид (например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans*), при повторном упоминании **родовое название сокращается** до одной буквы (*E.coli*, *S.aureus*, *S.lividans*).

11. Названия генетических элементов даются в трёхбуквенном обозначении латинского алфавита строчными буквами, курсивом (*tet*), кодируемыми соответствующими генетическими элементами продукты — прописными прямыми буквами (ТЕТ).

12. В журнале используются **международные непатентованные названия** (МНН) препаратов. Торговые (патентованные) названия, под которыми препараты выпускаются различными фирмами, приводятся в разделе «Материал и методы», с указанием фирмы-изготовителя и их международным непатентованным названием.

13. Цитируемые источники литературы во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте и заключаются в квадратные скобки. В библиографическом описании указываются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, год, количество страниц.

14. Статьи, ранее опубликованные или направленные в какой-либо другой журнал или сборник, не должны присылаться.

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

НАВСТРЕЧУ ЖИЗНИ. Реамберин®



Реамберин®

Форма выпуска:
Раствор для инфузий 1,5 %, в бутылках
стеклянных по 200 или 400 мл, в
контейнерах из плёнки многослойной
полиолефиновой по 250 или 500 мл

- ➔ ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ НЕОТЛОЖНЫХ СОСТОЯНИЯХ
И В ПЕРИОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ
- ➔ ИЗОТОНИЧЕСКИЙ ИНФУЗИОННЫЙ РАСТВОР
- ➔ СБАЛАНСИРОВАННАЯ ЭЛЕКТРОЛИТНАЯ
СТРУКТУРА
- ➔ КОМПЛЕКСНОЕ ДЕЙСТВИЕ



лекарственная форма
РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ



способ применения
ВНУТРИВЕННО КАПЕЛЬНО



фармакотерапевтическая группа
РАСТВОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ
НА ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ БАЛАНС



WWW.POLYSAN.RU



Интеллект на защите
здоровья

polysan