

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 64



5-6'2019

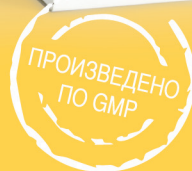
Научно-практический журнал

Ремаксол для печени – время для жизни!



Препарат инициальной терапии
при поражениях печени
различного генеза

- Воздействует на основные механизмы развития повреждения печени:
 - митохондриальную дисфункцию
 - повреждение клеточных мембран
 - оксидативный стресс
- активирует клеточное дыхание, повышает энергообеспечение
- стимулирует синтез нуклеотидов и обменные процессы в клетках
- способствует увеличению текучести мембран гепатоцитов, восполняет запасы глутатиона



РЕМАКСОЛ. Рег. № ФСР-009343/09 от 21.08.2017



Инфузионный гепатотропный препарат

* Распоряжение Правительства Российской Федерации от 10 декабря 2018 г. № 2738-р

www.polysan.ru

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 А. Б. Смирнова
Сайт: www.antibiotics-chemotherapy.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка через
«Агенство «Книга-Сервис»:
подписной индекс — **45071**

Подписка через официальный сайт
каталога «Пресса России»:
подписной индекс — **45071**

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

Установочный тираж 5000 экз.
© ГНЦА 2019

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: 2019

Свободная цена

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 64

5—6'2019

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора
Чл.-корр. РАН, профессор, д. б. н. Фирсов А. А.

Зам. главного редактора
профессор, д. м. н. Яковлев С. В.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Профессор, д. м. н. Белобородов В. А.
Академик РАН, профессор, д. б. н. Говорун В. М.
Профессор, д. б. н. Ильина Е. Н.
Профессор, д. м. н. Клишко Н. Н.
Профессор, д. м. н. Колбин А. С.
Профессор, д. м. н. Кочеровцев В. И.
Академик РАН, профессор, д. м. н. Лобзин Ю. В.
Профессор, д. х. н. Олсуфьева Е. Н.
Д. б. н. Переверзева Э. Р.
Д. м. н. Припутневич Т. В.
Профессор, д. м. н. Руднов В. А.
Д. б. н. Садыкова В. С.
Д. х. н. Тевяшова А. Н.
Профессор, д. х. н. Тишков В. Н.
Чл.-корр РАН, профессор, д. б. н. Тутельян А. В.
Профессор, д. м. н. Шляпников С. А.
Профессор РАН, д. х. н. Щекотихин А. Е.

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

**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

- Пьянков О. В., Боднев С. А., Зайковская А. В., Казаков В., Шмидт Г.
Ингибирование репликации вируса денге препаратом Инфлюцид *in vitro*
Журавлева М. В., Кукушкин Г. В., Свиридкина Л. П., Юров Д. Е., Каменева Т. Р.
Экспериментальное изучение фармакокинетики цефотаксима при совместном введении с препаратами, обладающими гиалуронидазной активностью
Логинова С. Я., Шукина В. Н., Борисевич С. В., Хамитов Р. А., Максимов В. А.
Изучение эффективности Ларифана® при экспериментальной форме тяжёлого острого респираторного синдрома
Долгова Д. Р., Генинг Т. П., Абакумова Т. В., Генинг С. О., Антонеева И. И., Песков А. Б., Федотова А. Ю.
Маркеры первичной химиорезистентности эпителиальных клеток асцита у больных раком яичников

В помощь практикующему врачу

- Цветкова И. А., Беланов С. С., Гостев В. В., Калиногорская О. С., Волкова М. О., Мохов А. С., Никитина Е. В., Калисникова Е. Л., Иванова К. А., Володина А. А., Сидоренко С. В.
Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг.
Запорожец Т. С., Крыжановский С. П., Персиянова Е. В., Кузнецова Т. А., Шутикова А. Л., Шевченко Н. М., Беседнова Н. Н.
Эффективность применения фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* при вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей
Липатов К. В., Комарова Е. А., Хрупкин В. И., Черкасов Ю. Е., Мирская М. А., Дехисси Е. И.
Характеристика возбудителей у пациентов с карбункулами и особенности антибактериальной химиотерапии
Коломиец В. М., Коваленко А. Л., Таликова Е. В.
Эффективность использования ремаксола в терапии сопровождения при запущенном туберкулёзе
Ганапольский В. П., Матыцин В. О., Гринчук С. С., Ятманов А. Н., Лопатина В. Ф., Заплутанов В. А.
Возможности и перспективы применения цитофлавина для повышения резервов адаптации специалистов, работающих в горных условиях
Рачина С. А., Белькова Ю. А., Козлов Р. С., Аникеев А. С., Толыго А. В., Бурасова Е. Г., Ежова Л. Г., Елохина Е. В., Мищенко В. М., Ни О. Г., Пензюган Г. А., Свентицкая Е. Е., Стреш Ю. А., Шегимова В. Д.
Одномоментное многоцентровое исследование использования антимикробных препаратов в российских стационарах: результаты проекта GLOBAL-PPS 2017

Обзоры

- Ефименко Т. А., Терехова Л. П., Ефременкова О. В.
Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий
Буданова Е. В., Горленко К. Л., Киселев Г. Ю.
Вторичные метаболиты растений: механизмы антибактериального действия и перспективы применения в фармакологии
Белов Б. С., Тарасова Г. М., Буханова Д. С.
Профилактика пневмоцистной пневмонии у пациентов с ревматическими заболеваниями: проблемы и поиск решений

Original Papers

- 3 Pyankov O. V., Bodnev S. A., Zaykovskaya A. V., Kazakov V., Schmidt G.
Inhibiting the Replication of the Dengue Virus Using *In Vitro* Influcid
9 Zhuravleva M. V., Kukushkin G. V., Sviridkina L. P., Yurov D. E., Kameneva T. R.
Experimental Study of The Pharmacokinetics of Cefotaxime with Joint Administration of Drugs with Hyaluronidase Activity
13 Loginova S. Ya., Shchukina V. N., Borisevich S. V., Hamitov R. A., Maksimov V. A.
Studying the Effectiveness of Lariphan® in the Experimental Form Severe Acute Respiratory Syndrome
18 Dolgova D. R., Gening T. P., Abakumova T. V., Gening S. O., Antoneeva I. I., Pescov A. B., Fedotova A. Yu.
Markers of Primary Chemoresistance of Epithelial Ascites Cells in Patients with Ovarian Cancer

Guidelines for Practitioners

- 22 Tsvetkova I. A., Belanov S. S., Gostev V. V., Kalinogorskaya O. S., Volkova M. O., Mokhov A. S., Nikitina E. V., Kalisnikova E. L., Ivanova K. A., Volodina A. A., Sidorenko S. V.
Clonality of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Russia, Circulating from 1980 to 2017
32 Zaporozhets T. S., Kryzhanovsky S. P., Persianova E. V., Kuznetsova T. A., Shutikova A. L., Shevchenko N. M., Besednova N. N.
Efficacy of Fucoidan from Brown Algae of the Okhotsk Sea *Fucus Evanescent* in Vaccination Against Seasonal Influenza in the Elderly People
39 Lipatov K. V., Komarova E. A., Khрупкин V. I., Cherkasov Yu. E., Mirskaya M. A., Dekhissi E. I.
Characteristic of Pathogens in Patients with Carbuncles and Features of Antibacterial Chemotherapy
44 Kolomiets V. M., Kovalenko A. L., Talikova E. V.
Efficiency of Remaxol Use in Supporting Treatment of Advanced Tuberculosis
49 Ganapolskiy V. P., Matytsin V. O., Grinchuk S. S., Yatmanov A. N., Lopatina V. F., Zaplutanov V. A.
Opportunities and Perspectives of the Use of Cytoflavin for Increasing the Adaptational Reserves of Experts Working in the Mountain Conditions
54 Rachina S. A., Belkova Yu. A., Kozlov R. S., Anikeev A. S., Tolpygo A. V., Burasova E. G., Ezhova L. G., Elokchina E. V., Mishchenko B. M., Ni O. G., Penzhoian G. A., Svntitskaia E. E., Strezh Yu. A., Shegimova B. D.
Point Prevalence Multicenter Survey of Antimicrobial Utilization in Russian Hospitals: the Results of GLOBAL-PPS 2017

Reviews

- 64 Efimenko T. A., Terekhova L. P., Efremenkova O. V.
Current State the Problem of Antibiotic Resistance of Pathogens
69 Budanova E. V., Gorlenko K. L., Kiselev G. Yu.
Secondary Plant Metabolites: Mechanisms of Antibacterial Action and Perspectives of Application in Pharmacology
77 Belov B. S., Tarasova G. M., Bukhanova D. S.
Prevention of Pneumocystic Pneumonia in Patients with Rheumatic Diseases: Problems and Solutions

* 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.

Ингибирование репликации вируса денге препаратом Инфлюцид *in vitro*

*О. В. ПЬЯНКОВ¹, С. А. БОДНЕВ¹, А. В. ЗАЙКОВСКАЯ¹, В. КАЗАКОВ², Г. ШМИДТ²

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область

² Дойче Хомеопати-Унион (ДХУ), Карлсруэ, Германия

Inhibiting the Replication of the Dengue Virus Using *In Vitro* Influcid

*O. V. PYANKOV¹, S. A. BODNEV¹, A. V. ZAYKOVSKAYA¹, V. KAZAKOV², G. SCHMIDT²

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Oblast

² Deutsche Homöopathie-Union (DHU), Karlsruhe, Germany

Отсутствие в настоящее время специфических противовирусных препаратов против лихорадки денге делает актуальной задачей поиск новых терапевтических средств терапии этой болезни. *Цель работы* — выявление ингибирующей активности препарата Инфлюцид *in vitro*. *Материал и методы*. В работе использовали штамм вируса денге DENV-2/RUS/TH-Novosibirsk02/2012 (субтип 2). Было изучено влияние препарата Инфлюцид на репликацию вируса в культуре клеток Vero на основании уменьшения цитопатического действия и накопления вируса в культуральной жидкости. *Результаты и выводы*. 50-процентная ингибирующая концентрация для препарата Инфлюцид составила 58 мг/мл. Успешное использование Инфлюцида при терапии острых респираторных инфекций и полученные в данном исследовании результаты говорят о возможности его применения при лечении лихорадки денге в качестве вспомогательной терапии.

Ключевые слова: вирус денге, Инфлюцид, противовирусная активность.

Given the lack of specific antiviral medicines to treat dengue fever, finding new medicinal products, including natural products, remains a highly pertinent goal. *The objective* of the study was to determine the antiviral activity of Influcid against dengue virus replication *in vitro*. *Material and methods*. Dengue virus DENV-2/RUS/TH-Novosibirsk02/2012 subtype 2 was used in this study. Vero cells were infected with dengue virus. Reduction of cytopathic effect and virus accumulation in culture fluid with the influence Influcid has been studied. *Results and conclusions*. The 50% inhibiting concentration of Influcid was determined as 58 mg/ml. The results obtained from these *in vitro* investigations show that Influcid is able to effectively inhibit dengue virus (subtype 2) replication in Vero cells. Since Influcid has a favorable benefit-risk profile it might be an option that can be used as treatment in addition to conventional medicine in patients suffering from dengue fever. The transferability of *in vitro* data to humans must show further investigations.

Keywords: dengue virus, Influcid, antiviral activity.

Введение

Лихорадка денге — острое инфекционное заболевание, передаваемое комарами и связанное с высокой смертностью и заболеваемостью [1]. Переносчиками вируса денге являются женские особи комаров, в основном вида *Aedes aegypti* и, в меньшей степени, *A. albopictus*. Возбудитель лихорадки денге входит в семейство *Flaviviridae*, род *Flavivirus*. Существует четыре субтипа вируса денге. На сегодняшний день около 50% населения мира в 125 странах проживают в районах, которые являются эндемичными для лихорадки денге [2]. Во всем мире ежегодно регистрируют около 50 млн случаев денге, из которых до 500 тыс. эпизодов протекают в тяжёлой форме и 20 тыс. случаев заканчиваются летальным исходом [3].

Спектр клинических проявлений денге может варьировать от недифференцированного ограниченного лихорадочного состояния до тяжёлой геморрагической формы лихорадки денге (ГЛД), при которой часто наблюдают желудочно-кишечные кровотечения, полиорганную недостаточность, ДВС-синдром и шок, реже — острую печёночную и почечную недостаточность, энцефалопатию, кардиомиопатию [4].

При флавивирусных инфекциях, включая ГЛД, важную роль играет феномен антитело-зависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE). Феномен ADE заключается в том, что вирусспецифические антитела усиливают проникновение вируса в фагоцитирующие клетки посредством взаимодействия с рецептором FcR и/или рецепторами комплемента на поверхности фагоцитирующих клеток. Первая инфекция, вызванная вирусом денге, чаще всего протекает у человека бессимптомно и даёт пожизненный иммунитет к вирусу серотипа, её вызвав-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: e-mail: pyankov@vector.nsc.ru

шего. Однако в случае инфицирования вирусом другого серотипа, вследствие феномена FcR-ADE, болезнь протекает в тяжёлой форме с большой вероятностью летального исхода (до 50%) [5].

Лечение вирусных геморрагических лихорадок в основном сводится к поддерживающей терапии, поддержанию водно-солевого баланса и коррекции гемодинамики. Рекомендуются обратить особое внимание на поддержание баланса жидкостей и электролитов, противошоковые мероприятия, возмещение потери крови, предотвращение развития почечной недостаточности у пациентов. Лечение таких больных может потребовать интенсивного ухода и специфических вмешательств, таких как механическая вентиляция лёгких, диализ и неврологическая помощь.

Таким образом, учитывая отсутствие специфических противовирусных препаратов против лихорадки денге, в настоящее время является актуальной задачей поиск новых терапевтических средств, включая препараты природного происхождения.

Цель исследования — выявление ингибирующей активности препарата Инфлюцид *in vitro*.

Материал и методы

Требования биобезопасности. Все работы с вирусом денге были проведены в ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, в отделе «Коллекция микроорганизмов», имеющего санитарно-эпидемиологическое заключение: 77.ПЧ.01.000.М.000091.11.16 от 10.11.2016 г. на право проведения исследований с вирусами I—II групп патогенности.

Исследования проводили в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

Препарат. Инфлюцид (Influcid) был получен от компании «Deutsche Homöopathie-Union DHU-Arzneimittel GmbH & Co. KG», Германия; серия 399; годен до 10/2018. Препарат Инфлюцид имеет сложный состав, который включает в себя следующие основные компоненты: *Aconitum D3, Gelsemium D3, Ipecacuanha D3, Phosphorus D5, Bryonia D2, Eupatorium perfoliatum D1*.

Вирус и клетки. В работе использовали штамм вируса денге DENV-2/RUS/TH-Novosibirsk02/2012 (субтип 2), полученный из «Государственной коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Гетеролоидные перевиваемые клетки почек зелёной африканской обезьяны Vero (African green monkey kidney) получены из ФГБУ «ГИСК им. Л. А. Тарасевича» на уровне 181 пассажа.

Культуру клеток Vero культивировали при температуре 37°C и 5% содержании CO₂. В качестве ростовой среды использовали среду DMEM (GIBCO, #41965-062) с 10% фетальной телячьей сывороткой (GIBCO, #10500064), 100 ед/мл бензилпенициллина натриевой соли и 100 мкг/мл стрептомицина сульфата. Для достижения 85—100% конфлюэнтности монослоя клеток на момент использования (24 ч) посевная концентрация должна быть $7,4 \times 10^4$ кл/см². Конфлюэнтность монослоя клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа при небольшом увеличении. Для последующих пересевов для снятия клеток использовали 0,25% раствор трипсина.

После инфицирования клеток вирусом в качестве поддерживающей среды использовали среду DMEM с 2% фетальной телячьей сывороткой и теми же антибиотиками (полная среда DMEM).

Анализ противовирусной активности. Для определения цитотоксичности препарата Инфлюцид в конфлюэнтный монослой клеток Vero в 96-луночных культуральных планшетах (Costar, Corning) добавляли разведения препарата в диапазоне от 1/2 до 1/256 объёмом 200 мкл и инкубировали в течение 72 ч (контроль под микроскопом). Цитотоксичность определялась с помощью МТТ теста. Цитотоксическая концентрация, вызывающая гибель 50% жизнеспособных клеток (CC₅₀), составила 37,5 мг/мл — 1/4 эквивалентной доли 1 таблетки препарата. Конфлюэнтный монослой клеток Vero в 96-луночных культуральных планшетах (Costar, Corning) был инфицирован в трёх повторах вирусом денге, разведённым в полной среде DMEM для получения множественности заражения 0,01. Через один час адсорбции вируса на клетки при 37°C вирусный инокулят удаляли, и монослой клеток промывали трёхкратно раствором Хенкса. Далее препарат Инфлюцид вносили в лунки с инфицированными клетками. Диапазон исследованных концентраций препарата Инфлюцид составлял от 1/4 до 1/128. Для разведения препаратов использовали полную среду DMEM. Планшеты с инфицированными и обработанными препаратом клетками инкубировали в течение десяти суток при температуре 37°C, 5% CO₂ в увлажнённой среде, после чего забирали супернатанты из каждой лунки. Часть аликвот была помещена в лизирующий буфер для постановки ПЦР, другую часть аликвот закладывали на хранение на минус 80°C для последующего вирусологического анализа.

Определение инфекционной активности вируса. Инфекционную активность вируса денге определяли по методу ЦПД на монослой культуры клеток Vero и выражали титр в ЦПД₅₀/мл. Конфлюэнтный монослой клеток Vero в 96 луночных культуральных планшетах был инфицирован в трёх повторах сериями 10-кратных разведений аликвот, полученных при проведении антивирусного анализа и исходным вирусом. Вирус адсорбировали в течение 1 ч, затем удаляли и замещали полной средой DMEM. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в увлажнённой воздушной среде. Через 10 сут. после заражения проводили учёт результатов с помощью инвертированного микроскопа по цитопатическому действию (ЦПД) вируса на клетки и рассчитывали инфекционный титр с помощью метода Риды—Менча [6].

Молекулярно-биологический анализ с помощью ПЦР. Подготовку образцов и выделение РНК проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

Выделение вирусной РНК из образцов культуры клеток проводили с помощью набора QIAmpViral RNA Mini Kit (Qiagen, США). ПЦР проводили с использованием набора реагентов AB Ambion Ag Path-ID One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems, США) с набором праймеров и зондом к субтипу 2 вируса денге, описанных в патенте № 2483115 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», РФ). Термоциклирование и считывание флуоресценции проводили с помощью прибора RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) по программе, описанной в патенте.

Результаты и обсуждение

Для оценки противовирусной активности препарата Инфлюцид *in vitro* было изучено его влияние на репликацию вируса денге в культуре клеток Vero. Для этого чувствительные клетки были заражены штаммом DENV-2/RUS/TH-Novosibirsk02/2012 (субтип-2). Через 1 ч адсорбции инфицированные клетки подвергли лечению препаратом Инфлюцид. На 10-й день после заражения были отобраны супернатанты для вирусологического и молекулярно-биологического анализов.

Инфлюцид

ИНФОРМАЦИЯ
для специалиста

Натуральный индуктор интерферона
с выраженной противовирусной активностью,
для превентивной и поддерживающей
терапии при гриппе и ОРВИ для всей семьи

**Инфлюцид оказывает комплексное
терапевтическое действие при гриппе и ОРВИ*:**

- ✓ противовирусное
- ✓ иммуномоделирующее
- ✓ цитопротекторное
- ✓ симптоматическое

*Хаселен ван Р и др. Журнал "Glob Pediatr Health". 2016 год, №3, стр. 1-11.

Еропкин М. Ю. и др. Журнал "Русский медицинский журнал". 2011 год, №18, стр. 1151-1155.



Сделано в Германии

Официальный представитель в России:
ООО «Альпен Фарма» Тел.: +7 495 609 6572,
info.russia@alpenpharma.com www.alpenpharma.ru



Таблица 1. Ингибирование репликации вируса денге DENV-2/RUS/TH-Novosibirsk02/2012 (субтип-2) препаратом Инфлюцид

№ п/п	Концентрация активных компонентов препарата Инфлюцид, мг/мл* (эквивалентная доля таблетки)	Титр вируса (log ₁₀ ЦПД ₅₀ /мл ±σ**)
1	1,17 (1/128)	4,37±0,17
2	2,34 (1/64)	4,26±0,17
3	4,69 (1/32)	3,99±0,17
4	9,38 (1/16)	3,56±0,18
5	18,75 (1/8)	2,96±0,18
6	0 (контроль вируса)	4,57±0,17

Примечание. * — Таблетированная форма препарата: *Aconitum D3* — 25 мг; *Gelsemium D3* — 25 мг; *Ipecacuanha D3* — 25 мг; *Phosphorus D5* — 25 мг; *Bryonia D2* — 25 мг; *Eupatorium perfoliatum D1* — 25 мг. Шесть активных компонентов в равных долях в составе таблетки имеют суммарную массу 150 мг.

** — Среднеквадратичное отклонение.

Таблица 2. Эффективные концентрации препарата Инфлюцид, ингибирующие репликацию вируса денге в культуре клеток Vero

Параметр	CC ₅₀ (I ₉₅)*	IC ₅₀ (I ₉₅)*	IC ₉₀ (I ₉₅)*	IC ₉₉ (I ₉₅)*
Эквивалентная доля таблетки	0,25	0,014 (0,006–0,022)	0,062 (0,037–0,218)	0,206 (0,088–2,442)
Концентрация активных компонентов препарата Инфлюцид, мг/мл	37,5	2,10 (0,90 – 3,30)	9,30 (5,55 – 32,70)	30,90 (13,20 – 366,30)

Примечание. * — Доверительный интервал для $p=0,95$.

В клетках *Vero* препарат Инфлюцид уменьшал цитопатический эффект (ЦПЭ), начиная с концентрации 4,69 мг/мл, и снижал на 1,61 log₁₀ ЦПЭ при 18,75 мг/мл (табл. 1).

50-процентная ингибирующая концентрация (IC₅₀) препарата Инфлюцид была определена и составила 2,11 мг/мл (табл. 2). Значения IC₉₀ (снижение ЦПЭ на 1 логарифм, т. е. в 10 раз) и IC₉₉ (снижение ЦПЭ на 2 логарифма, т. е. в 100 раз) также были определены (см. табл. 2). Как видно из табл. 2, значение концентрации препарата Инфлюцид для эффективного ингибирования вируса денге достаточно велико, что может ограничить его использование для терапевтического применения.

Показатели ингибирующих концентраций препарата Инфлюцид в отношении вируса денге, полученные в данном исследовании, демонстрируют, что он способен эффективно ингибировать репликацию вируса денге 2-го типа в культуре клеток *Vero*. Низкая токсичность препарата в испытаниях *in vitro* свидетельствует о безопасности его применения. Анализируя полученные результаты можно предположить, что его использование в качестве вспомогательной терапии для лечения пациентов с лихорадкой денге будет эффективным. Необходимы дальнейшие испытания эффективности инфлюцида при лечении лихорадки денге на животных моделях и пациентах.

Реальное количество случаев заболевания денге не отражается в полной мере, и многие случаи заболевания классифицируются неправильно. Согласно одной недавней оценке, ежегодно лихорадкой денге заражаются 390 млн человек (95% доверительный интервал — 284÷528 млн человек), из которых у 96 млн (67÷136 млн) имеют-

ся клинические проявления (разной тяжести болезни) [7]. По оценке из другого исследования, посвящённого распространённости денге, риску заражения вирусами денге подвергаются 3900 млн человек в 128 странах [8].

В 2010 г. денге была впервые зарегистрирована во Франции и Хорватии, а завезённые случаи заболевания были выявлены в трёх других европейских странах. В 2012 г. вспышка денге на островах Мадейра (Португалия) насчитывала более 2 000 случаев заболевания, а завезённые случаи заболевания были выявлены в 10 других странах Европы, помимо континентальной Португалии.

Для 2015 г. были характерны крупные вспышки денге во всем мире — в Филиппинах было зарегистрировано более 169 тыс. случаев заболевания, а в Малайзии — более 111 тыс. предполагаемых случаев денге, то есть число случаев заболевания возросло по сравнению с предыдущим годом на 59,5 и 16%, соответственно. Кроме того, в 2015 г. в Дели (Индия) была зарегистрирована самая крупная вспышка за весь период с 2006 г. — более 15 тыс. случаев заболевания.

Все это является основанием для поиска новых терапевтических препаратов, возможно, не направленных на вирус как таковой или его взаимодействие с клеткой (специфическая терапия), например, стимулирующих клеточную резистентность, выработку интерферонов, иммунную защиту. Вследствие этого остаётся актуальным использование неспецифических препаратов, включая растительные и гомеопатические препараты. В частности, на возможность такого подхода указывают данные по использованию экстракта папайи при заболевании, вызванном вирусом денге.

Кровотечение разной степени тяжести наблюдается в основном при тяжёлой форме лихорадки денге, т. е. геморрагической лихорадке денге. Патогенез кровотечения включает потерю плазмы. Это, как представляется, происходит из-за разрушения тромбоцитов, опосредованного системой комплемента и/или угнетением костного мозга вирусной инфекцией. Кроме того, отмечается, что тромбоциты, избежавшие разрушения становятся нефункциональными или менее функциональными [9].

По данным с недавней вспышки лихорадки денге в Индии, было отмечено резкое увеличение спроса на сок из листьев папайи. Ажиотаж был вызван сообщением по использованию папайи в лечении лихорадки денге, в связи с его предполагаемым благотворным влиянием на количество тромбоцитов [10]. В некоторых публикациях был представлен состав папайи, включающий несколько активных компонентов (флавоноиды, алкалоиды и ферменты), которые могут обладать антиоксидантным и иммуномодулирующим действием и которое, как предполагается, будет давать терапевтический эффект от применения водного экстракта из листьев папайи (*Carica papaya*) [11].

Хотя, в соответствии с руководящими принципами ВОЗ, количество тромбоцитов не считается одним из критериев для ГЛД и рассматривается только как предупреждающий симптом, тем не менее, в исследованиях показана прогностическая способность количества тромбоцитов для оценки тяжести лихорадки денге [12]. Количество тромбоцитов также коррелирует с интенсивностью кровоизлияний и повреждениями печени [13].

В обзорной публикации были приведены данные по рандомизированным контролируемым испытаниям 377 пациентов с подтверждённым диагнозом ГЛД, которые принимали экстракт из листьев папайи. Было показано достоверное увеличение количества тромбоцитов у пациентов, которые принимали экстракт по сравнению с контрольной группой и снижение

дней госпитализации. Но в тоже время, не было представлено данных по побочным явлениям и смертности.

На данный момент времени мало публикаций, в которых был бы изучен фактический механизм терапевтического действия экстракта из листьев папайи на вирус денге. Ряд исследователей считают, что положительный эффект может быть связан с улучшением стабилизации мембран эритроцитов или способностью флавоноидов ингибировать протеазы, участвующие в сборке вируса денге, или с антиоксидантными свойствами экстракта, которые могут помочь в предотвращении гемолиза и кровотечений.

В нашем исследовании в экспериментах *in vitro* показано, что препарат Инфлюцид ингибирует репликацию вируса денге. Ранее другими исследователями было показано его противовирусное действие в отношении целого ряда актуальных штаммов вируса гриппа — сезонных штаммов A(H1N1) и пандемического штамма 2009 г. — A(H1N1)pdm, A(H3N2), A(H5N1) и штаммов гриппа B, а также вирусов герпеса человека 1-го и 2-го типов и аденовируса III типа [14]. Кроме того, в исследованиях с вирусом гриппа и ОРВИ было показано, что Инфлюцид оказывает стимулирующее действие на продукцию интерферона клетками и увеличивает резистентность клеток к цитопатогенному действию вирусов, что так же может являться ключевым моментом при лечении вирусных инфекций [15].

Заключение

Инфлюцид можно рассматривать как кандидатный этиотропный препарат для лечения больных лихорадкой денге. С учётом результатов, полученных в данном исследовании *in vitro*, изучение противовирусной активности препарата Инфлюцид целесообразно продолжить в тестах *in vivo*.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаращенко Т.И., Гаращенко М.В., Мезенцева М.В. Клинико-иммунологическое обоснование гомеопатических препаратов в профилактике и лечении гриппа и ОРВИ. Русский медицинский журнал. — 2005. — Т. 13. — № 13. — С. 1432—1437. / Garashchenko T.I., Garashchenko M.V., Mezentsева M.V. Kliniko-immunologicheskoe obosnovanie gomeopaticheskikh preparatov v profilaktike i lechenii grippa i ORVI. Russkiy meditsinskiy zhurnal 2005; 13 (13): 1432—1437.
2. Krishnamurti C., Kalayanaroop S., Cutting M.A., Peat R.A., Rothwell S.W., Reid T.J., Green S., Nisalak A., Endy T.P., Vaughn D.W., Nimmannitiya S., Innis B.L. et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. Am J Trop Med Hyg 2001; 65: 840—847.
3. Еропкин М.Ю., Григорьева В.А., Гудкова Т.М., Коновалова Н.И., Т.Г. Лобова, Байбус Д.М., Ягловская И.Б. Активность препарата «Инфлюцид» в отношении вирусов гриппа в модельных системах. МЕДЛАЙН-Экспресс. — 2007. — № 6. — С. 23—26. / Eroptkin M.Yu., Grigor'eva V.A., Gudkova T.M., Konovalova N.I., T.G. Lobova, Baybus D.M., Yaglovskaya I.B. Aktivnost' preparata «Inflyutsid» v otnoshenii virusov grippa v model'nykh sistemakh. MEDLAYN-Ekspress 2007; 6: 23—26. [in Russian]
4. Reed L.J., Muench H.A. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am J Hygien 1938; 27: 493—497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
5. Ho T.S., Wang S.M., Lin Y.S., Liu C.C. Clinical and laboratory predictive markers for acute dengue infection. J Biomed Sci 2013; 20: 75. DOI: 10.1186/1423-0127-20-75.
6. Subenthiran S., Choon T.C., Cheong K.C., Thayan R., Teck M.B., Muniandy P.K., Afzan A., Abdullah N.R., Ismail Z. Carica papaya leaves juice significantly accelerates the rate of increase in platelet count among patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. Evid. Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 616737. DOI: 10.1155/2013/616737
7. Verdeal J., Filho R.C., Vanzillotta C., De Macedo G.L., Bozza F.A., Toscano L., Prata A., Tanner A.C., Machado F.R. et al. Guidelines for the management of patients with severe forms of dengue. Rev Bras TerIntensiva 2011; 23 (2): 125—133.
8. Boonnak K., Slike B.M., Burgess T.H., Mason R.M., Wu S.J., Sun P., Porter K., Rudiman I.F., Yuwono D., Puthavathana P., Marovich M.A. et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of

dengue virus infection. J Virol 2008; 82 (8): 3939–3951. DOI: 10.1128/JVI.02484-07.

9. Brady O.J., Gething P.W., Bhatt S., Messina J.P., Brownstein J.S., Hoen A.G., Moyes C.L., Farlow A.W., Scott T.W., Hay S.I. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1760. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001760.
10. Srichaikul T., Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 2000; 13: 261–276.
11. Sarala N., Paknikar S. Papaya extract to treat dengue: A novel therapeutic option? Ann Med Health Sci Res 2014; 4: 320–324. DOI: 10.4103/2141-9248.133452.
12. Bhatt S., Gething P.W., Brady O.J., Messina J.P., Farlow A.W., Moyes C.L., Drake J.M., Brownstein J.S., Hoen A.G., Sankoh O., Myers M.F.,

George D.B., Jaenisch T., Wint G.R., Simmons C.P., Scott T.W., Farrar J.J., Hay S.I. et al. The global distribution and burden of dengue. Nature 2013; 496 (7446): 504–507. DOI: 10.1038/nature12060496:504-507.

13. Jayashree K., Manasa G.C., Pallavi P., Manjunath G.V. Evaluation of platelets as predictive parameters in dengue fever. Indian J Hematol Blood Transfus 2011; 27: 127–130. DOI: 10.1007/s12288-011-0075-1.
14. Rajapakse S., Rodrigo C., Rajapakse A. Treatment of dengue fever. Infect. Drug Resist 2012; 5: 103–112. DOI: 10.2147/IDR.S22613.
15. WHO Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition World Health Organization, Geneva (2009) Available from: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf> [Accessed on 14th May, 2016].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Пьянков Олег Викторович — к. б. н., зав. отделом, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Боднев Сергей Александрович — к. б. н., зав. лабораторией, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, <https://orcid.org/0000-0003-0599-3817>

Зайковская Анна Владимировна — к. б. н., с. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

Казаков Вячеслав — проект-менеджер международного отдела, Дойче Хомеопати-Унион (ДХУ), Карлсруэ, Германия

Шмидт Георг — руководитель международного отдела, Дойче Хомеопати-Унион (ДХУ), Карлсруэ, Германия

Экспериментальное изучение фармакокинетики цефотаксима при совместном введении с препаратами, обладающими гиалуронидазной активностью

М. В. ЖУРАВЛЕВА^{1,2}, *Г. В. КУКУШКИН³, Л. П. СВИРИДКИНА, Д. Е. ЮРОВ³, Т. Р. КАМЕНЕВА⁴

¹ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

³ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

⁴ ГБУ здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница им. М. П. Кончаловского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва

Experimental Study of the Pharmacokinetics of Cefotaxime with Joint Administration of Drugs with Hyaluronidase Activity

M. V. ZHURAVLEVA^{1,2}, *G. V. KUKUSHKIN³, L. P. SVIRIDKINA, D. E. YUROV³, T. R. KAMENEVA⁴

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

³ N. I. Pirogov Russian National Research Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

⁴ M. P. Konchalovsky City clinical hospital of Department of Health of Moscow, Moscow

Показано, что предварительное введение препаратов, способствующих поступлению антибиотиков в лимфатическую систему, повышает клиническую эффективность лечения. В настоящее время существует потребность в экспериментальном обосновании такого подхода к антибактериальной терапии. В данном исследовании изучено влияние препаратов с гиалуронидазной активностью на скорость лимфатического дренажа тканей и фармакокинетику цефотаксима. В работе определены время удаления лимфотропного красителя синий Эванс из брыжейки мышей при его введении на фоне гиалуронидазы и бовгиалуронидазы азоксимера, концентрация цефотаксима в динамике в течение суток в плазме крови кроликов и в плазме крови, тканях кишечника и печени мышей через 1,5 и 24 ч после совместного введения антибиотика с гиалуронидазой и бовгиалуронидазой азоксимером. Установлено, что и гиалуронидаза, и бовгиалуронидаза азоксимер являются эквивалентными стимуляторами лимфатического дренажа тканей. Полученные данные свидетельствуют о наличии свойств эндолимфатического проводника не только у гиалуронидазы, но и у бовгиалуронидазы азоксимера, дополнительные свойства которой позволяют рассматривать её в качестве приоритетного препарата при проведении лимфотропной терапии.

Ключевые слова: гиалуронидаза, бовгиалуронидаза азоксимер, цефотаксим, фармакокинетика, лимфатический дренаж.

It is shown that the preliminary administration of drugs that promote the flow of antibiotics into the lymphatic system increases the clinical effectiveness of treatment. Currently, there is a need for experimental justification of this approach to antibacterial therapy. In this study, the effect of drugs with hyaluronidase activity on the rate of lymphatic tissue drainage and the pharmacokinetics of cefotaxime was studied. We determined the time of the removal of lymphotropic blue dye evans of the mesentery of mice when administered on the background of hyaluronidase and bovhyaaluronidaze azoximer, the concentration of cefotaxime in the dynamics during the day in blood plasma of rabbits and in the blood plasma, the intestinal tissues and the liver of mice after 1.5 and 24 h after the co-administration of antibiotic with hyaluronidase and bovgelerinde anoxemia. It is found that the hyaluronidase, and bovhyaaluronidaze azoximer are equieffective stimulants of lymphatic drainage of tissues. The data obtained indicate the presence of endolymphatic properties of the conductor not only on hyaluronidase, but at bovhyaaluronidaze azoximer, additional properties which allow to consider it as a priority of the drug when conducting lymphotropic therapy.

Key words: hyaluronidase, bovhyaaluronidaze azoximer, cefotaxime, pharmacokinetics, lymphatic drainage.

Введение

Бовгиалуронидаза азоксимер (БГЛРД азоксимер) — ферментный препарат с гиалуронидазной активностью пролонгированного действия, кото-

рое обусловлено наличием в его составе высокомолекулярного носителя — азоксимера. Препарат деполимеризует матрикс соединительной ткани и одновременно подавляет синтез её компонентов, обладает повышенной термостабильностью и устойчивостью к воздействию ингибиторов [1]. Известно, что при проведении лимфотропной терапии (непрямого эндолимфатическо-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, РНИМУ им. И. М. Сеченова

Таблица 1. Сравнение влияния ГЛРД и БГЛРД азоксимера на концентрацию (мкг/мл) ЦФ в плазме крови кроликов ($M \pm m$)

Препараты	Время от начала введения						
	1,5 ч	3 ч	4,5 ч	6 ч	8 ч	12 ч	24 ч
ЦФ	35,91±4,87	6,21±0,90	1,81±0,17	0,43±0,06	0,32±0,06	0,25±0,03	0,12±0,01
ГЛРД+ЦФ	99,33±8,15 $p_1 < 0,001$	46,06±3,49 $p_1 < 0,001$	11,69±0,69 $p_1 < 0,001$	5,07±0,50 $p_1 < 0,001$	1,85±0,21 $p_1 < 0,001$	0,89±0,08 $p_1 < 0,001$	0,52±0,06 $p_1 < 0,001$
БГЛРД азоксимер + ЦФ	66,23±4,87 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,01$	28,70±1,65 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,005$	7,19±0,46 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	3,12±0,32 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	1,94±0,16 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,2$	1,23±0,06 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	0,83±0,09 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$

Примечание. p_1 — показатель статистической значимости концентраций ЦФ по отношению к группе животных с его моноведением; p_2 — показатель статистической значимости при сравнении концентраций ЦФ к группам животных с введением ЦФ после ГЛРД и БГЛРД азоксимера.

го введения лекарственных средств) в качестве препарата-проводника широко используется гиалуронидаза (ГЛРД) [2—9]. В доступной литературе мы встретили лишь одну статью, в которой сообщалось об изучении эффективности лимфотропной антибактериальной терапии с применением БГЛРД азоксимера в качестве препарата-проводника у больных хроническим простатитом [10]. При этом фармакокинетика антибиотиков при таком введении не изучалась. Ранее в наших исследованиях на мышах были получены предварительные данные о влиянии ГЛРД и БГЛРД азоксимера на концентрацию цефотаксима (ЦФ) в плазме крови мышей [11]. Эти результаты показали необходимость дальнейшего изучения фармакокинетических параметров совместного применения ЦФ и препаратов с гиалуронидазной активностью в сравнительном аспекте.

Цель исследования — сравнить влияние ГЛРД и БГЛРД азоксимера на скорость лимфатического дренажа (ЛД) тканей и фармакокинетику ЦФ.

Материал и методы

Влияние препаратов с ферментной активностью на скорость ЛД тканей исследовали на 32 белых беспородных мышах в четырёх группах животных: двух контрольных и двух основных (по 8 животных в каждой группе). Мышам основных групп исследований под общей анестезией за 15 мин до начала определения скорости ЛД тканей в заднюю лапу вводили 0,1 ЕД ГЛРД (лидаза, флаконы по 64 УЕ, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России) или 8 МЕ БГЛРД азоксимера (лонгидаза, флаконы по 1500 МЕ, ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия). Животным контрольных групп вводили 0,3 мл физиологического раствора. Скорость ЛД тканей определяли по времени (мин) удаления из брыжейки предварительно введённого в нее 2% раствора лимфотропного красителя Evans blue («Merck») в объёме 0,002 мл. Формирование контрольных групп отдельно для каждой основной группы исследований было продиктовано необходимостью уменьшения погрешностей, вызванных внешними воздействиями.

Фармакокинетику ЦФ (клафоран, флаконы по 1,0 г, Авестис Фарма Лтд, Великобритания) изучали на 27 половозрелых кроликах массой 3 кг. Животным контрольной группы (9 кроликов) внутримышечно в верхнюю треть задней конечности вводили ЦФ в дозе 140 мг. Кроликам основных групп (по 9 животных в каждой) такую же дозу антибиотика вводили через 5 мин после предварительной инъекции 4 ЕД ГЛРД или 420 МЕ БГЛРД азоксимера. Забор крови производили из краевой вены уха кроликов в течение суток через 1,5 и 3 ч, 4,5 и 6 ч, 8, 12 ч и 24 ч после инъекции лекарственных препаратов.

Дополнительно концентрацию ЦФ определяли у 54 белых беспородных мышей массой 20 г в трёх контрольных и трёх основных группах (по 9 мышей в каждой группе). Животным контрольной группы в мышцу задней лапы вводили 3 мг ЦФ. Мышам основных групп такую же дозу антибиотика вводили через 5 мин после предварительной инъекции 0,1 ЕД ГЛРД или 8 МЕ БГЛРД азоксимера. Концентрацию ЦФ определяли в тканях печени, стенки кишечника и плазме крови мышей через 1,5 ч (первые группы экспериментов) и 24 ч (вторые группы экспериментов) после введения препаратов. Для оценки состояния процессов элиминации антибиотика печенью рассчитывали соотношение его концентраций «ткань/плазма крови».

Концентрацию ЦФ в плазме крови и тканях животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Во всех сериях экспериментов дозы препаратов для мышей и кроликов рассчитывали с учётом коэффициента пересчёта с человека на животное [12].

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики по Стьюденту для связанных и несвязанных величин и корреляционного анализа.

Результаты исследования

Время удаления лимфотропного красителя из брыжейки мышей при введении ГЛРД составляло 29,87±0,72 мин, а в контрольной группе животных — 40,5±0,42 мин ($p < 0,001$). БГЛРД азоксимер укорачивала время выведения красителя синий Эванса с 48,50±0,42 мин, зарегистрированных в контрольной группе животных, до 32,25±1,36 мин ($p < 0,001$). Следовательно, ГЛРД ускоряла ЛД тканей на 26,2%, а БГЛРД азоксимер — почти на 34%.

Как ГЛРД, так и БГЛРД азоксимер, увеличивали концентрацию ЦФ в плазме крови кроликов во всех временных точках исследования (табл. 1). После предварительного введения БГЛРД азоксимера через 1,5 ч, 3 ч, 4,5 ч и 6 ч содержание антибиотика в плазме крови животных было ниже, чем после использования ГЛРД. Через 8 ч эксперимента плазменные уровни ЦФ в обеих основных группах становились одинаковыми. Через 12 и 24 ч концентрация антибиотика в плазме крови была выше в группе животных с предварительным введением БГЛРД азоксимера по сравнению с кроликами, которым ЦФ вводился после ГЛРД.

Результаты определения концентраций ЦФ в тканях и плазме крови мышей представлены в табл. 2.

Таблица 2. Концентрация цефотаксима в тканях кишечника, печени (мкг/г), плазме крови (мкг/мл) мышей и соотношение концентраций антибиотика «ткань печени/плазма крови» через 1,5 и 24 ч после его введения различными способами ($M \pm m$)

Препараты	Время после введения	
	1,5 ч	24 ч
Ткань кишечника		
ЦФ	0,412±0,072	0,154±0,031; $p_1 < 0,05$
ГЛРД+ЦФ	1,501±0,109; $p_2 < 0,001$	0,472±0,084; $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,01$
БГЛРД азоксимер+ЦФ	0,615±0,071; $p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,001$	0,354±0,074; $p_1 < 0,01$; $p_2 < 0,05$; $p_3 > 0,2$
Ткань печени		
ЦФ	0,275±0,021	0,033±0,009; $p_1 < 0,001$
ГЛРД+ЦФ	0,263±0,038; $p_2 > 0,2$	0,040±0,011; $p_1 < 0,001$; $p_2 > 0,2$
БГЛРД азоксимер+ЦФ	0,255±0,043; $p_2 > 0,2$; $p_3 > 0,2$	0,044±0,008; $p_1 < 0,005$; $p_2 > 0,2$; $p_3 > 0,2$
Плазма крови		
ЦФ	0,126±0,021	0,016±0,004; $p_1 < 0,001$
ГЛРД+ЦФ	0,334±0,042; $p_2 < 0,005$	0,069±0,013; $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,01$
БГЛРД азоксимер+ЦФ	0,206±0,025; $p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$	0,111±0,011; $p_1 < 0,01$; $p_2 < 0,01$; $p_3 < 0,05$
Соотношение концентраций «ткань печени/плазма крови»		
ЦФ	2,18±0,18	2,06±0,41; $p_1 > 0,2$
ГЛРД+ЦФ	0,79±0,05; $p_2 < 0,001$	0,58±0,22; $p_1 > 0,2$; $p_2 < 0,05$
БГЛРД азоксимер+ЦФ	1,24±0,19; $p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$	0,40±0,09; $p_1 < 0,005$; $p_2 < 0,005$; $p_3 > 0,2$

Примечание. p_1 — показатель статистической значимости при сравнении концентраций ЦФ в группах животных через 1,5 и 24 ч после введения; p_2 — показатель статистической значимости концентраций ЦФ по отношению к группе животных с его моновведением; p_3 — показатель статистической значимости при сравнении концентраций ЦФ к группам животных с введением ЦФ после ГЛРД и БГЛРД азоксимера.

Ткань кишечника. Во всех группах исследования через 24 ч концентрация ЦФ была ниже, чем через 1,5 ч после введения. На фоне предварительных инъекций ГЛРД или БГЛРД азоксимера регистрировалось повышение уровня антибиотика по сравнению с группой животных с его моновведением как через 1,5 ч, так и через 24 ч наблюдения. Через 1,5 ч концентрация ЦФ после предварительного введения ГЛРД была выше, чем в случае его совместного введения с БГЛРД азоксимера, а через 24 ч этой разницы не отмечалось.

Ткань печени. Через 24 ч концентрация ЦФ по сравнению с его уровнем через 1,5 ч уменьшалась. Предварительное введение ГЛРД или БГЛРД азоксимера не оказывало влияния на содержание антибиотика ни через 1,5 ч, ни через 24 ч после его введения.

Плазма крови. Во всех группах исследования наблюдалось снижение концентрации ЦФ в течение 24 ч. Через 1,5 ч и спустя 24 ч содержание антибиотика было выше в группах мышей, которым ЦФ вводили после ГЛРД или БГЛРД азоксимера, чем у животных, получавших только антибиотик. При сравнении влияния двух препаратов с гиалуронидазной активностью через 1,5 ч уровень ЦФ был выше в группе мышей, которым антибиотик вводили на фоне ГЛРД, однако через 24 ч наибольшая концентрация регистрировалась у животных с предварительной инъекцией БГЛРД азоксимера.

Соотношение концентраций ЦФ «ткань печени/плазма крови». В группах мышей с моновведением ЦФ и с совместной инъекцией антибиотика с ГЛРД через 1,5 и 24 ч показатель был одинаковым. При использовании БГЛРД азоксимера через

сутки он уменьшался. В обеих группах наблюдения, в которых антибиотик вводили после инъекции ГЛРД или БГЛРД азоксимера, рассчитанный показатель был ниже, чем у животных с моновведением ЦФ. При этом через 1,5 ч он был ниже в группе мышей, получавших ЦФ на фоне ГЛРД, однако через 24 ч соотношение концентраций антибиотика «ткань печени/плазма крови» в обеих основных группах исследований не различалось.

Заключение

Установлено, что и ГЛРД, и БГЛРД азоксимер являются эквивалентными стимуляторами ЛД тканей. Они увеличивают концентрацию ЦФ в плазме крови кроликов в течение суток. Это подтверждают и данные, полученные при изучении плазмы крови мышей. У кроликов и у мышей через 1,5 ч уровень ЦФ выше при использовании в качестве препарата-проводника ГЛРД, а через 24 ч — БГЛРД азоксимера. Оба препарата способствуют повышению накопления антибиотика в ткани кишечника во всех временных точках исследования, но не влияют на его уровень в ткани печени. Соотношение концентраций ЦФ «ткань печени/плазма крови» уменьшается при использовании как ГЛРД, так и БГЛРД азоксимера. Полученные данные свидетельствуют о наличии свойств эндолимфатического проводника не только у ГЛРД, но и у БГЛРД азоксимера. При этом более высокая концентрация ЦФ в плазме крови кроликов и мышей через сутки после предварительного введения БГЛРД азоксимера, чем после инъекции ГЛРД, позволяет предположить, что пролонгирующее действие на поддержание высоко-

го уровня антибиотика в крови у БГЛРД азоксимера более выражено, чем у ГЛРД. Установлено, что БГЛРД азоксимер не обладает антигенными и алергизирующими свойствами, не ока-

ЛИТЕРАТУРА

1. Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Карапатадзе Н.Т. Физико-химические принципы создания лонгидазы. Иммунология. — 2006. — № 2. — С. 114—108. / Nekrasov A.V., Puchkova N.G., Karaputadze N.T. Fiziko-khimicheskiye printsipy sozdaniya longidazy. Immunologiya 2006; 2: 114—108. [in Russian]
2. Дабузов А.Ш., Абдурахманова Р.А., Бабаева С.А. Лимфотропная терапия у родильниц в послеоперационном периоде после радикальных операций. Современные проблемы науки и образования. — 2016. — № 6. — С. 104. / Dabuzov A.Sh., Abdurakhmanova R.A., Babayeva S.A. Limfotropnaya terapiya u rodil'nits v posleoperatsionnom periode posle radikal'nykh operatsiy. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya 2016; 6: 104. [in Russian]
3. Дирксен П.В., Чикинев Ю.В., Любарский М.С., Ким И.Н., Марченко А.В. Регионарная лимфотропная терапия в раннем послеоперационном периоде у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. — 2012. — № 5 (2). — С. 393—396. / Dirksen P.V., Chikinev Yu.V., Lyubarskiy M.S., Kim I.N., Marchenko A.V. Regionarnaya limfotropnaya terapiya v ranнем posleoperatsionnom periode u patsiyentov s khronicheskoy ishemiyey nizhnikh konechnostey. Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii 2012; 5 (2): 393—396. [in Russian]
4. Левин Ю.М. Патогенетическая терапия (устранение анахронизмов). Новые принципы и методы. М.: РУДН, 2014. — С. 351. / Levin Yu.M. Patogeneticheskaya terapiya (ustraneniye anakhronizmov). Novyye printsipy i metody. M.: RUDN, 2014; 351. [in Russian]
5. Насриддинов З.М., Шаймарданов Р.Ш. Регионарная лимфотропная терапия при остром панкреатите. Казанский медицинский журнал. — 2002. Т. 83. — № 6. — С. 468—469. / Nasridinov Z.M., Shaymardanov R.Sh. Regionarnaya limfotropnaya terapiya pri ostrom pankreatite. Kazanskiy meditsinskiy zhurnal 2002; 83 (6): 468—469. [in Russian]
6. Свиридкина Л.П., Батышева Т.Т., Кузьмина З.В., Топорова С.Г. Лимфотропная терапия дорсопатии при грыжах дисков поясничного отдела позвоночника. Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2011. — № 1. — С. 36—40. / Sviridkina L.P., Batysheva T.T., Kuz'mina Z.V., Toporova S.G. Limfotropnaya terapiya dorsopatii pri gryzhakh diskov poynasnichnogo otdela pozvonochnika. Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta 2011; 1: 36—40. [in Russian]
7. Човдурбаев Н.Ж., Исмаилов Ж.К., Рахметов Н.Р., Рахметова К.У., Туткышбаев С.О., Жетписбаева Н.К., Апчел В.Я., Ионцев В.И. Лим-

фотропная терапия в комплексном лечении туберкулёза периферических лимфатических узлов. Вестник российской военно-медицинской академии. — 2016. — № 56 (4). С. 95—98. / Chovdurbayev N.Zh., Ismailov Zh.K., Rakhmetov N.R., Rakhmetova K.U., Tutkysbayev S.O., Zhetpishbayeva N.K., Apchel V.YA., Iontsev V.I. Limfotropnaya terapiya v kompleksnom lechenii tuberkuleza perifericheskikh limfaticeskikh uzlov. Vestnik rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii 2016; 56 (4): 95—98. [in Russian]

8. Haller M.F. Converting Intravenous Dosing to Subcutaneous Dosing With Recombinant Human Hyaluronidase. Pharmaceut Technol 2007; 31 (10): 118—132.
9. Richter W.F., Jacobsen B. Subcutaneous Absorption of Biotherapeutics: Knowns and Unknowns. Drug Metabolism and Disposition 2014; 42 (11): 1881—1889.
10. Мкртчян А.М., Кайсинова А.С., Кочарян Г.В. Бальнеопелоидо- и лимфотропная терапия в медицинской реабилитации больных хроническим простатитом. Курортная медицина. — 2015. — № 1. — С. 70—75. / Mkrtchyan A.M., Kaysinova A.S., Kocharyan G.V. Bal'neopeloido- i limfotropnaya terapiya v meditsinskoy reabilitatsii bol'nykh khronicheskim prostatitom. Kurortnaya meditsina 2015; 1: 70—75. [in Russian]
11. Свиридкина Л.П., Баркинхоева Ф.А., Юров Д.Е., Кукушкин Г.В., Топорова С.Г., Козлов И.Г. Оптимизация фармакокинетики лекарственных средств путём использования эндолимфатических препаратов-проводников. Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2008. — № 1 (19). — С. 67—69. / Sviridkina L.P., Barkinkhoyeva F.A., Yurov D.Ye., Kukushkin G.V., Toporova S.G., Kozlov I.G. Optimizatsiya farmakokinetiki lekarstvennykh sredstv putem ispol'zovaniya endolimfaticeskikh preparatov-provodnikov. Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki 2008; 1 (19): 67—69. [in Russian]
12. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. и др. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во Челябинского государственного педагогического университета. 2000. — С. 167. / Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L. i dr. Eksperimental'noye modelirovaniye i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma. Chelyabinsk: Izd-vo Chelyabinskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. 2000; 167. [in Russian]
13. Шмырева В.Ф., Иванова А.С., Федоров А.А., Петров С.Ю., Макарова А.С. Медико-биологическое исследование лонгидазы. Часть 1. Глаукома. — 2011. — № 4. — С. 5—10. / Shmyreva V.F., Ivanova A.S., Fedorov A.A., Petrov S.YU., Makarova A.S. Mediko-biologicheskoye issledovaniye longidazy. Chast' 1. Glaukoma 2011; 4: 5—10. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Журавлева Марина Владимировна — д. м. н., профессор, зам. директора ЦКФ, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва

Кукушкин Герман Владимирович — к. м. н., профессор кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

Свиридкина Людмила Петровна — д. м. н., Москва

Юров Дмитрий Евгеньевич — к. м. н., старший преподаватель кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

Каменева Татьяна Рудольфовна — к. м. н., клинический фармаколог, ГБУ здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница им. М. П. Кончаловского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва

Изучение эффективности Ларифана® при экспериментальной форме тяжёлого острого респираторного синдрома

С. Я. ЛОГИНОВА¹, В. Н. ЩУКИНА¹, *С. В. БОРИСЕВИЧ¹, Р. А. ХАМИТОВ², В. А. МАКСИМОВ¹

¹ 48 Центральный НИИ МО РФ, Сергиев Посад

² Международный биотехнологический центр «Генериум», Москва

Studying the Effectiveness of Lariphan® in the Experimental Form Severe Acute Respiratory Syndrome

S. YA. LOGINOVA¹, V. N. SHCHUKINA¹, *S. V. BORISEVICH¹, R. A. HAMITOV², V. A. MAKSIMOV¹

¹ Federative State Central Research Institute No. 48 of the Ministry of Defense of Russia, Sergiev Posad

² International Biotechnology Center «Generium», Moscow

Проведены исследования по изучению эффективности высокомолекулярного индуктора интерферона Ларифана® в отношении экспериментальной формы тяжёлого острого респираторного синдрома у сирийских хомяков. Показано, что Ларифан® эффективен при применении его по профилактической схеме и схеме экстренной профилактики. Коэффициент лечебного действия по вирусологическим, гематологическим и биохимическим показателям составил 57,5 и 65,0%, соответственно ($p < 0,05$ и $p < 0,01$).

Ключевые слова: Ларифан®, тяжёлый острый респираторный синдром, профилактика, коэффициент лечебного действия.

Studies have been carried out to study the effectiveness of the high-molecular inducer of interferon Lariphan® in relation to the experimental form of severe acute respiratory syndrome in Syrian hamsters. It is shown that Lariphan® is effective when applied in a preventive scheme, and the scheme of emergency prevention. The coefficient of therapeutic action for virological, hematological and biochemical parameters was 57.5 and 65.0%, respectively ($p < 0.05$ and $p < 0.01$).

Keywords: Lariphan®, severe acute respiratory syndrome, prevention, coefficient of therapeutic action.

Введение

В современном мире постоянно меняется спектр вирусной патологии: появляются новые и выходят из-под контроля хорошо и давно изученные заболевания. Заболевание тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС) впервые возникло в ноябре 2002 г. в Южном Китае [1–6]. В результате проведённых исследований обнаружен очень узкий круг эффективных лекарственных препаратов в отношении ТОРС, при оценке их эффективности *in vitro* [7–14]. В последние годы выявили новый коронавирус — возбудитель заболевания ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [15].

Цель работы — оценка противовирусной эффективности Ларифана® в отношении возбудителя тяжёлого острого респираторного синдрома.

Материал и методы

Вирусы. В работе использовали вирус тяжёлого острого респираторного синдрома, штамм СоД, выделенный специа-

листами ВЦ НИИМ из носоглоточного смыва больного ТОРС из Благовещенска [16]. Хранился при температуре минус $70 \pm 10,0^\circ\text{C}$ в лиофилизированном виде.

Культура клеток. Использована перевиваемая культура клеток почек зелёных мартышек — Vero E6. В качестве среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Хенкса, содержащую 2% сыворотки крупного рогатого скота, соответственно.

Исследуемый препарат. Ларифан® (инъекционный) — дс РНК фага f_2 *E. coli* производства Института микробиологии им. Кирхенштейна, Латвия. Перед применением препарат растворяли в физиологическом растворе. Индуктор интерферона вводили внутримышечно по схемам профилактики и экстренной профилактики.

Лабораторные животные. Использованы сирийские хомяки массой 40–60 г. Животных заражали перорально в дозе 5,0 IgБОЕ. сразу после инфицирования животным всех групп вводили линкомицин в дозе 10^3 ед. внутримышечно [12]. Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 21 сут., контролировали клинические признаки заболевания, гибель животных. На 2-, 4-, 6- и 10-е сутки у инфицированных животных тотально отбирали кровь для проведения гематологических и биохимических исследований.

Токсичность исследуемых препаратов оценивали на неинфицированных сирийских хомяках.

Оценка противовирусной эффективности Ларифана® осуществлена в соответствии с требованиями [17, 18].

Основными критериями оценки эффективности являлись показатели снижения уровня накопления вируса в лёгких (ΔIg) и уровня лейкоцитоза, нормализация биохимических

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 141306, г. Сергиев Посад-6. 48 ЦНИИ

показателей крови (АлАТ, АсАТ, КФК, ЛДГ, мочевины и креатинина) и лейкограммы [19].

Результаты и обсуждение

Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу тяжёлого респираторного синдрома при различных способах заражения показало, что инфекция у них не вызывает летального исхода. В связи с этим оценку эффективности препаратов проводили по комплексу клинико-вирусологических показателей.

Результаты исследования показывают, что высокомолекулярный индуктор интерферона (ИИФ) Ларифан® эффективно подавляет репродукцию вируса в лёгких на пике инфекции (4-е сутки после инфицирования сирийских хомяков) при применении как по профилактической схеме, так и экстренной профилактики. Применение ИИФ по профилактической схеме и схеме экстренной профилактики обеспечило снижение уровня накопления вируса в лёгких на 2,3 и 2,1 lg на 4-е сутки и на 3,3 lg — на 10-е сутки после инфицирования, соответственно (табл. 1). Коэффициент ингибирования вируса ТОРС при введении Ларифана® составил 99,4%.

Патологоанатомическое обследование инфицированных и леченных сирийских хомяков показало, что на 2-е сутки после инфицирования все внутренние органы остаются без видимых изменений. Ларифан® снижал тяжесть поражения лёгких возбудителем ТОРС (при визуальной оценке). Обширность кровоизлияний и отёчность ткани лёгкого на 4- и 6-е сутки была выражена в меньшей степени (50%), чем у животных, инфицированных вирусом ТОРС. На 10-е сутки после инфицирования у животных, которым вводили внутримышечно Ларифан®, отёки в лёгких отсутствовали, точечные кровоизлияния отмечали в единичных случаях в области лёгких, расположенной ближе к входам в бронхи.

Чаще всего спутниками инфекционных болезней и воспалительных процессов являются истинные лейкоцитозы. Изучение влияния Ларифана® на динамику изменения суммарного пула лейкоцитов и лейкоцитарной формулы показало, что применение препарата по изученным схемам сопровождается в начальный период наблюдения

выраженным лейкоцитозом с последующей нормализацией к 6—10-м суткам ($5,9\text{--}6,2 \times 10^9/\text{л}$). Для интактных животных этот показатель составил $(6,0\text{--}6,5) \times 10^9/\text{л}$, инфицированных (не принимавших препарат) — $12,8 \times 10^9/\text{л}$.

Отмечено появление на пике инфекции молодых форм нейтрофилов. Индекс сдвига (ИС) для интактных сирийских хомяков составил 0,11, для инфицированных (на пике инфекции) — 0,24. Таким образом, происходит изменение лейкограммы влево, что характерно для многих тяжёлых инфекций, когда увеличение количества нейтрофилов происходит в основном за счёт увеличения количества палочкоядерных и юных форм. Кроме того, отмечали с 4-х суток снижение относительного количества лимфоцитов.

Анализ лейкоцитарной формулы показал, что профилактическое применение Ларифана® сопровождалось угнетением гранулопоэза и увеличением количества лимфоцитов (ИС=0,36) с нарастанием лимфоцитоза к 10-м суткам наблюдения. На более поздних стадиях заболевания отмечены лимфоцитоз, увеличение количества моноцитов, что свидетельствует о наступлении фазы выздоровления и благоприятном исходе заболевания.

При экстренной профилактике ТОРС у сирийских хомяков Ларифаном® отмечена активизация гранулоцитарной фракции лейкоцитов с увеличением как палочкоядерных, так и сегментоядерных нейтрофилов, при этом значение ИС составляло 0,82—1,43 (на 4-е сутки после инфицирования). На 6—10-е сутки этот показатель несколько снизился, но был достоверно выше значения у группы интактных животных.

Исследования по изучению влияния Ларифана® на биохимические показатели крови инфицированных сирийских хомяков показали, что наибольшую активность в процессе нормализации показателей КФК и ЛДГ выявил препарат, вводимый по профилактической схеме (см. табл. 1).

Высокий уровень КФК, по-видимому, связан с повреждением ткани лёгких. Ларифан® по профилактической схеме значительно снижал воспалительные и некротические повреждения в лёгких и, соответственно, снижался уровень КФК. Начиная с 6-х суток после инфицирования, был отмечен процесс нормализации показателей ЛДГ

Таблица 1. Влияние Ларифана® на динамику изменения активности креатинфосфокиназы и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Схема введения препарата	Показатель	Активность, сутки после инфицирования			
		2-е	4-е	6-е	10-е
-24, -1 ч	Креатинфосфокиназа, $\bar{X} \pm \sigma_x$, мккат/л	0,67±0,02	0,79±0,02	0,68±0,06	0,53±0,05
+2, +72, +144, +216 ч		0,92±0,03	0,83±0,02	0,70±0,04	0,49±0,01
Контроль (инфицированные)		1,27±0,04	2,12±0,03	1,16±0,05	1,22±0,02
Контроль (интактные)		0,44±0,03	0,39±0,02	0,48±0,01	0,50±0,04
-24, -1 ч	Лактатдегидрогеназа, $\bar{X} \pm \sigma_x$, МЕ/л	474±12	765±5	575±5	501±9
+2, +72, +144, +216 ч		521±11	772±6	672±8	665±15
Контроль (инфицированные)		1915±56	1447±54	1805±55	1803±15
Контроль (интактные)		405±32	402±15	409±13	399±18

Таблица 2. Влияние Ларифана® на динамику изменения активности аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Схема введения препарата	Показатель	Активность, сутки после инфицирования			
		2-е	4-е	6-е	10-е
-24, -1 ч	Аланинаминотрансфераза,	0,89±0,02	1,02±0,02	0,86±0,03	0,88±0,10
+2,+72,+144,+216 ч	$X \pm \sigma_x$, мкМ/(ч • л)	0,87±0,03	1,27±0,03	1,22±0,07	0,98±0,04
Контроль (инфицированные)		1,44±0,18	2,53±0,05	2,01±0,03	2,32±0,04
Контроль (интактные)		0,65±0,08	0,66±0,08	0,69±0,05	0,70±0,02
-24, -1 ч	Аспартатаминотрансфераза,	0,75±0,05	0,70±0,04	0,93±0,06	1,00±0,08
+2,+72,+144,+216 ч	$X \pm \sigma_x$, мкМ/(ч • л)	0,69±0,07	0,84±0,04	1,34±0,06	1,08±0,02
Контроль (инфицированные)		2,14±0,09	2,62±0,04	1,85±0,06	2,23±0,07
Контроль (интактные)		0,71±0,09	0,73±0,09	0,71±0,06	0,74±0,02

Таблица 3. Влияние Ларифана® на динамику изменения креатинина и мочевины в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Схема введения препарата	Показатель	Активность, сутки после инфицирования			
		2-е	4-е	6-е	10-е
-24, -1 ч	Креатинин,	151,0±1,00	152,2±1,20	138,6±0,60	177,6±0,40
+2,+72,+144,+216 ч	$X \pm \sigma_x$, мМ/л	165,2±1,20	146,1±0,90	126,3±0,60	135,5±0,60
Контроль (инфицированные)		210,0±1,00	255,7±1,00	247,9±0,30	213,5±0,5
Контроль (интактные)		181,2±0,80	184,5±0,40	180,2±0,20	180,5±0,5
-24, -1 ч	Мочевина,	3,8±0,2	6,8±0,2	4,8±0,4	7,1±0,3
+2,+72,+144,+216 ч	$X \pm \sigma_x$, мМ/л	5,8±0,1	7,8±0,2	6,9±0,3	7,5±0,5
Контроль (инфицированные)		8,5±0,2	9,1±0,6	10,8±0,3	11,8±0,4
Контроль (интактные)		5,9±0,1	5,4±0,3	5,6±0,1	5,7±0,1

и КФК у всех животных, получавших препарат. У животных, которым вводили Ларифан®, уровень КФК оставался достоверно ниже, чем у инфицированных животных, не получавших препараты на протяжении всего срока наблюдения.

Аминоацилтрансферазы широко представлены в тканях сердца, печени, почках, меньше — в селезенке, лёгких, поджелудочной железе. В норме сыворотка крови содержит только цитозольные ферменты. При различных заболеваниях происходит повышение ферментативной активности. Таким образом, аспартат- и аланинаминотрансферазы являются индикаторными ферментами, характеризующими появление синдрома цитолиза гепатоцитов. Как указывалось выше, для больных ТОРС характерно повышение уровня аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ) в ранние сроки заболевания. Важным диагностическим показателем является соотношение АсАТ и АлАТ (коэффициент де Ритиса).

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что у сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, на протяжении всего срока наблюдения после заражения наблюдается повышение активности как АсАТ, так и АлАТ, в 2—4 раза по сравнению с неинфицированными животными. Коэффициент де Ритиса для интактных сирийских хомяков составил в среднем 1,07.

Применение Ларифана® по профилактической схеме снижает активность аминотрансфераз более чем в 1,4 раза по сравнению с группой животных, не получавших препарат. Уровень АлАТ после повышения на 2-е сутки уже на 4—6 сутки не отличался от уровня у интактных животных.

На пике инфекции (4-е сутки) коэффициент де Ритиса при применении Ларифана® составлял 0,66—0,69.

Проведены так же исследования по изучению динамики изменения уровня креатинина и мочевины в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, под воздействием Ларифана® (табл. 3).

Уровень креатинина в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, увеличивался незначительно по сравнению с интактными животными. Кратность увеличения этого показателя на пике инфекции составила 1,4 раза. При применении Ларифана® по всем изученным схемам и дозам не отмечено сколько-нибудь значительного увеличения концентрации креатинина в сыворотке крови сирийских хомяков по сравнению с интактными животными.

Введение по профилактической схеме Ларифана® также способствовало нормализации уровня мочевины в крови экспериментальных животных на 6—10-е сутки после инфицирования, в то же время по схеме экстренной профилактики такой эффект не наблюдался — уровень мочевины оставался достоверно выше по сравнению с интактными животными.

Для анализа влияния исследуемого препарата на тяжесть течения заболевания ТОРС у экспериментальных животных провели рейтинговую оценку степени выраженности следующих показателей: уровень накопления вируса в лёгких; степень патологоанатомических изменений внутренних органов; количество лейкоцитов; изменения в лейкоцитарной формуле крови; изменение фер-

Таблица 4. Влияние Ларифана® на тяжесть течения инфекционного процесса у сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Препарат	Схема применения препарата	Анализ тяжести течения инфекционного процесса				
		на пике инфекции			в течении всего срока наблюдения	
		сумма баллов	индекс тяжести заболевания	коэффициент лечебного действия, %	значение критерия знаков	уровень значимости лечебной эффективности препарата, <i>p</i>
Ларифан,	-24 ч, - 1ч	17	0,425	57,5	9/10	0,05
5 мг/кг	+2,+72,+144,+216 ч	13	0,325	67,5	10/10	0,01
Контроль (инфицированные)	—	40	1,000	—	0/10	—

ментативной активности КФК, ЛДГ, АсАТ, АлАТ; изменение концентрации мочевины и креатинина. Максимальная выраженность каждого из указанных признаков на пике инфекции (4–6-е сутки) оценивалась в 4 балла.

По указанным признакам рассчитывали значения критерия знаков и соответствующие уровни значимости влияния исследуемых препаратов на течение инфекционного процесса в течение всего срока наблюдения (табл. 4).

Высокомолекулярный ИИФ Ларифан® эффективно снижает тяжесть заболевания у сирийских хомяков, перорально инфицированных ви-

русом ТОРС в дозе 5,0 lg БОЕ, при введении его по профилактической схеме и схеме экстренной профилактики. Коэффициент лечебного действия составил 57,5 и 67,5%, соответственно.

При этом был отмечен статистически высокий уровень достоверных отличий тяжести течения заболевания у леченных и контрольных животных ($p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А. и др. Выделение и идентификация возбудителя тяжёлого острого респираторного заболевания от больного атипичной пневмонией. ЖМЭИ. — 2003. — № 5. — С. 109—112. / Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A. i dr. Vy'delenie i identifikaciya vozбудitelya tyazhelogo ostrogo respiratornogo zabol'evaniya ot bol'nogo atipichnoj pnevmonii. ZhME'I 2003; 5:109—112. [in Russian]
2. Синопольников А.И., Воробьев А.В., Белоцерковская Ю.Г., Андреева И.В. Тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС, SARS). Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2003. — № 5 (3). — С. 225—242. / Sinopol'nikov A.I., Vorob'ev A.V., Belocerkovskaya Yu.G., Andreeva I.V. Tyazhelyj ostryj respiratornyj sindrom (TORS, SARS). Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya ximioterapiya 2003; 5 (3): 225—242. [in Russian]
3. Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. New Engl J Med 2003; 348 (20): 1947—1958.
4. Lee N., Hui D., Wu A., Chan P. et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome on Hong Kong. New Engl J Med 2003; 348 (20): 1986—1994.
5. Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet 2003; 361: 1319—1325.
6. World Health Organization: <http://www.who.int/csr/sars/en/index.html>.
7. Hensley L., Fritz E., Jahrling P., Karp C., Huggins J.W., Geisbert T.W. Interferon-β 1a and SARS coronavirus replication. Emerg Infect Dis 2004; 10 (2): 317—319. doi: 10.3201/eid1002.030482.
8. Koren G., King S., Knowles S., Phillips E. Ribavirin in treatment of SARS: A new Trick for an old drug? Can Med Ass J 2003; 168 (10): 1231.
9. Liu Z.Y., Li T.S., Wang Z., et al. Clinical features and therapy of 106 cases of severe acute respiratory syndrome Zhonghua Nei Ke Za Zhi 2003; 42: 373—377.
10. Pak C., Lam C., Li A. et al. Inflammatory cytokine profile in children with severe acute respiratory syndrome. Pediatrics 2004; 113 (1): 7—14.
11. Tan E.L.C., Ooi E.E., Tan H.C. et al. Inhibition of SARS Coronavirus infection in vitro with clinical approved antiviral drugs. Emerg Infect Dis [serial online] 2004; Apr [cited 2004 February 24]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no4/03-0458.htm>
12. Zhao Z., Zhang F., Xu M. et al. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China J Med Microbiol 2003; 52: 715—720.
13. Zhaori G. Antiviral treatment of SARS: Can we draw any conclusions? CMAJ 2003; 169 (11): 1165—1166.
14. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М.: Мед, 1996. — 239 с. / Ershov F.I. Sistema interferona v norme i pri patologii. M.: Med, 1996; 239.
15. Жуматов К.Х., Кыдырманов А.И. Ближневосточный респираторный синдром (mers-middleeastrespiatorysyndrome): новая коронавирусная инфекция человека и животных. Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика. — 2015. — № 3. — С. 4—10. / Zhumatov K.X., Kydyrmanov A.I. Blizhnevostochnyj respiratornyj sindrom (mers-middleeastrespiatorysyndrome): novaya koronavirusnaya infekciya cheloveka i zhivotny'x. Biotechnology. Theory and Practice/Biotexnologiya. Teoriya i praktika 2015; 3: 4—10. [in Russian]
16. Сыроматникова С.И., Писцов М.Н., Степанов Н.Н., Борисевич С.В., Меркулов В.А., Марков В.И., Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А. Штамм СоД вируса тяжёлого острого респираторного синдрома рода Coronavirus, предназначенный для разработки средств и методов биологической защиты. Патент РФ № 2263144, 27.10.2005. / Syromyatnikova S.I., Piszov M.N., Stepanov N.N., Borisevich S.V., Merkulov V.A., Markov V.I., Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A. Shtamm SoD virusa tyazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma roda Coronavirus, prednaznachennyj dlya razrabotki sredstv i metodov biologicheskoy zashhity. Patent RF № 2263144, 27.10.2005. [in Russian]
17. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005. / Rukovodstvo po e'ksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novy'x farmakologicheskix veshhestv. M.: Minzdrav RF, 2005. [in Russian]
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 2. М.: Минздрав РФ, 2013. / Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskix issledovanij lekarstvenny'x sredstv. Chast' 2. M.: Minzdrav RF, 2013. [in Russian]
19. Логинова С.Я., Фалдина В.Н., Сыроматникова С.И., Борисевич С.В., Хамитов Р.А., Максимов В.А. Способ моделирования тяжёлого острого респираторного синдрома у экспериментальных животных. Патент РФ №2280288, 20.07.2006. / Loginova S.Ya., Faldina V.N., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V., Xamitov R.A., Maksimov V.A. Sposob modelirovaniya tyazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma u e'ksperimental'ny'x zhivotny'x. Patent RF №2280288, 20.07.2006. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Щукина Вероника Николаевна — к. б. н., научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, член-корр. РАН РФ, начальник института, Федеральное

государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Хамитов Равиль Авгатович — д. м. н., профессор, генеральный директор, Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «Генериум», Москва

Максимов Владимир Алексеевич — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Маркеры первичной химиорезистентности эпителиальных клеток асцита у больных раком яичников

Д. Р. ДОЛГОВА, *Т. П. ГЕНИНГ, Т. В. АБАКУМОВА, С. О. ГЕНИНГ,
И. И. АНТОНЕЕВА, А. Б. ПЕСКОВ, А. Ю. ФЕДОТОВА

Ульяновский государственный университет, Ульяновск

Markers of Primary Chemoresistance of Epithelial Ascites Cells in Patients with Ovarian Cancer

D. R. DOLGOVA, *T. P. GENING, T. V. ABAKUMOVA, S. O. GENING,
I. I. ANTONEEVA, A. B. PESCOV, A. YU. FEDOTOVA

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk

Определяли маркеры первичной химиорезистентности (экспрессия генов ERCC1, TOP2a и ABCB1) в эпителиальных клетках асцита 32 первичных больных с верифицированным раком яичников с использованием ОТ-ПЦР. После стандартной химиотерапии по схеме AP (цисплатин+доксорубин) оценивали безрецидивную выживаемость пациенток по Каплан–Майеру. Были выделены больные с ранним (до 6 мес.) и поздним (более 6 мес.) рецидивом. В результате проведенных исследований установлено, что ранний рецидив имел место у 67% обследованных (безрецидивный период составил $88,7 \pm 13,3$ дня). При этом в группах с повышенной экспрессией безрецидивный период значимо не различался, имели место ранние рецидивы. Использование Cochrane Q-test позволило установить, что при сниженных уровнях ERCC1 и ABCB1 доля выживших составляет 72,7% ($p < 0,157$); снижение ERCC1 и повышение TOP2a повышает вероятность выживания до 75%; снижение ERCC1 и снижение TOP2a определяет вероятность выживания у 69,2% пациентов ($p < 0,157$). Следовательно, для прогнозирования возможного ответа на стандартную химиотерапию по схеме AP при асцитном раке яичников целесообразно оценивать в эпителиальных клетках асцита экспрессию 2 показателей — ERCC1 и ABCB1.

Ключевые слова: рак яичников, асцит, гены лекарственной устойчивости, безрецидивная выживаемость.

Determined the primary chemoresistance markers (expression of genes ERCC1, TOP2a and ABCB1) in epithelial cells of ascites 32 primary patients with verified ovarian cancer using RT-PCR. After standard chemotherapy by the AR scheme (cisplatin+doxorubicin), the relapse-free survival of patients was assessed by Kaplan–Mayer. Patients with early (up to 6 months) and late (more than 6 months) relapse were isolated. As a result of the conducted studies it was established that early relapse occurred in 67% of the examined patients (the relapse-free period was 88.7 ± 13.3 days). At the same time, in the groups with increased expression, the relapse-free period did not differ significantly, there were early relapses. The use of the Cochrane Q-test has allowed to establish that the reduced levels of ERCC1 and ABCB1, the proportion of survivors is to 72.7% ($p < 0.157$ inch); decrease in ERCC1 and increased TOP2a increases the probability of survival to 75%; reduction of ERCC1 and reduced TOP2a determines the probability of survival of 69.2% ($p < 0.157$ inch). Therefore, to predict the possible response to standard chemotherapy by the AR scheme in ascitic ovarian cancer, it is advisable in the epithelial cells of ascites to evaluate the expression of 2 parameters — ERCC1 and ABCB1.

Keywords: ovarian cancer, ascites, drug resistance genes, relapse-free survival.

Введение

Проблема химиорезистентности возникла на заре химиотерапии (ХТ), когда на фоне введения химиопрепаратов возникал интенсивный рост опухоли, расцениваемый как прогрессирование заболевания [1]. Однако существующие стандарты не предусматривают при назначении ХТ учёта молекулярно-генетических особенностей опухоли. Эпителиальный рак яичников — самый смертоносный гинекологический рак во всем мире. Химиорезистентность является одной из основ-

ных причин неудачи лечения [2]. Персонализированное лечение больных раком яичников (РЯ) сегодня, видимо, должно учитывать тот факт, что клетки солидной и рецидивной асцитной форм могут существенно отличаться по набору и количеству экспрессируемых молекулярных маркеров [3]. Асцит может образовываться с момента возникновения заболевания и включать опухолевые клетки, устойчивые к препаратам I линии химиотерапии, используемым при терапии солидного РЯ. Препараты платины сегодня широко применяются при лечении РЯ. При этом полностью или частично на платиносодержащую терапию I линии отвечают только порядка 80% пациенток [4, 5]. Следовательно, каждая 5-я пациентка получает

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 432017, г. Ульяновск, ул. Архитектора Ливчака, д. 2, УГУ. E-mail: Naum-53@yandex.ru

токсичное и неэффективное лечение. На сегодняшний день показана роль системы репарации повреждений ДНК и, в частности, эндонуклеазы ERCC1-XPF в механизмах развития резистентности РЯ к препаратам платины. Рядом исследователей показано, что уровень транскрипции ERCC1, белка, участвующего в вырезании повреждённого участка ДНК, коррелирует с чувствительностью клеточных линий РЯ к препаратам платины [6]. Система АТФ-связанных касетных транспортёров является одним из основных механизмов лекарственной устойчивости. Это белки семейства ABC, которые осуществляют АТФ-зависимый транспорт в том числе и цитостатиков. Регуляция экспрессии генов ABC-транспортёров возможна на уровне опухолевых клеток и организма в целом. При этом под влиянием химиопрепаратов экспрессия ABC-транспортёров повышается [7]. Роль различных представителей семейства ABC-транспортёров в развитии первичной и приобретённой химиорезистентности изучается. Показано, в частности, что длительная цисплатиновая терапия сопровождалась повышенной экспрессией ABCB1 [8]. Также показано, что повышение экспрессии ABCB1 при РЯ коррелирует с укорочением безрецидивного периода [9]. Топоизомераза 2А — продукт гена TOP2A — участвует в изменении структуры хроматина в процессе репликации ДНК. Доксорубин связывается с комплексом ДНК-топоизомераза 2А и блокирует митоз, т.е. экспрессия белка TOP2A определяет чувствительность опухолевых клеток к доксорубину. Однако данные относительно связи экспрессии TOP2A с эффективностью доксорубиносодержащей терапии достаточно противоречивы. Показано, что увеличение экспрессии TOP2A коррелирует с большей эффективностью антрациклиносодержащих схем и лучшей общей выживаемостью [10–12]. Однако, по данным других авторов [13], повышение экспрессии TOP2 в опухолевой ткани при карциноме яичников коррелировало с более коротким средним временем жизни.

Исходя из вышеизложенного целью исследования была оценка маркеров первичной химиорезистентности в эпителиальных клетках асцита больных РЯ.

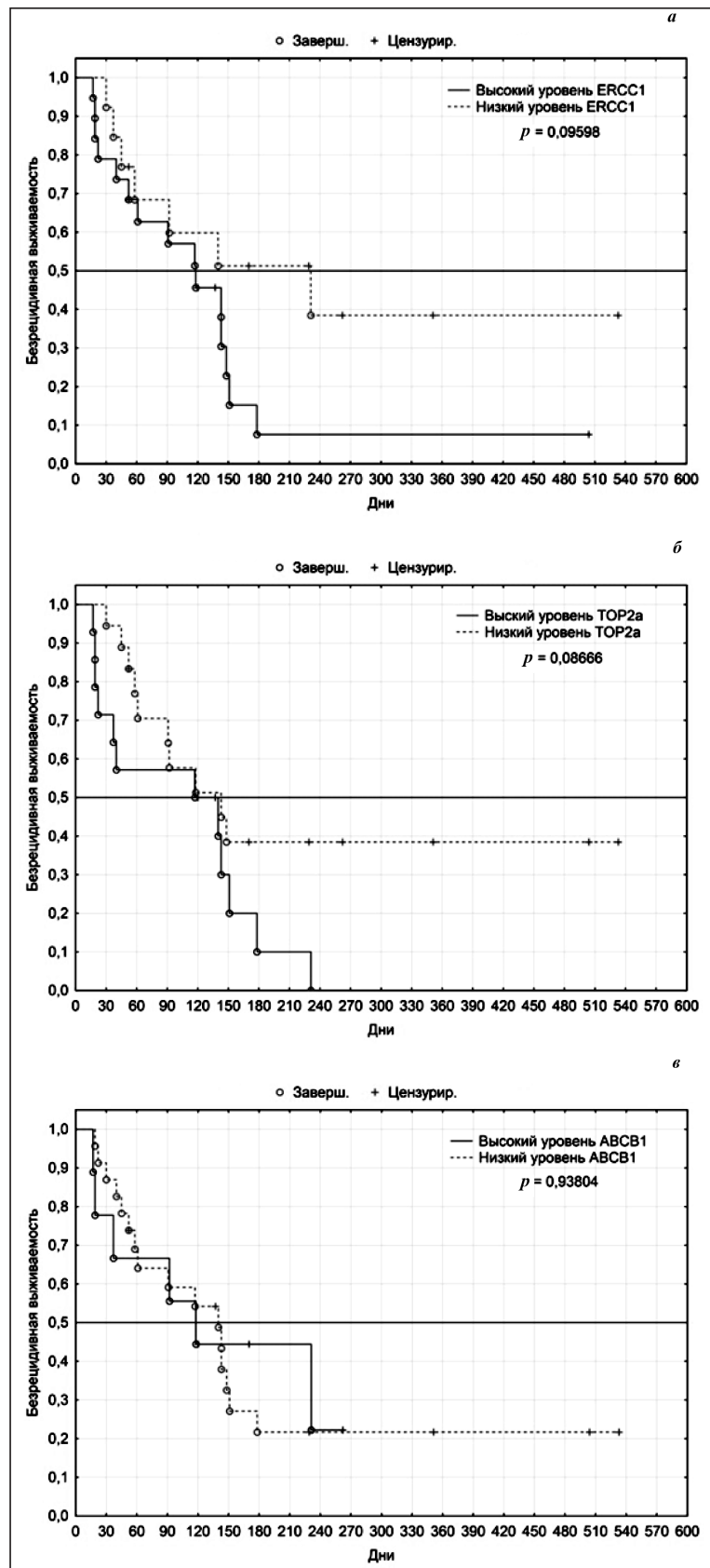


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость по Каплан-Майеру в зависимости от уровня транскрипта генов химиорезистентности. а — экспрессия ERCC1 в клетках асцита; б — экспрессия TOP2a в клетках асцита; в — экспрессия ABCB1 в клетках асцита.

Материал и методы

Обследованы 32 больных с морфологически верифицированным асцитным РЯ в возрасте 36–80 лет (медиана 61,5 года) на III–IV клинических стадиях по FIGO. У всех обследованных наличие опухолевых клеток в асцитической жидкости подтверждено цитологически. По гистотипу большинство злокачественных опухолей представляли собой серозную аденокарциному (68,8%), эндометриоидную аденокарциному (в 31,2% случаев). Пациентки обследованы стандартно, они получали стандартную химиотерапию по схеме AP (цисплатин+доксорубин). В зависимости от времени возникновения рецидива после последнего курса ХТ все пациентки были разделены на 2 группы: с ранним рецидивом (до 6 мес.) и с рецидивом после 6 мес. Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике ИМЭиФК ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 3 от 15.03.2015 г.).

Для выделения эпителиальных клеток из асцитической жидкости биоматериал центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин, осадок промывали в фосфатном солевом буфере (pH 7,4) и сохраняли в растворе, стабилизирующем РНК, при -80°C . Экстракция и очистка тотальной РНК проходила согласно протоколам производителя (ExtractRNA и CleanRNA Standard, ООО «Евроген», г. Москва) с последующей ОТ-ПЦР. В работе были использованы зонды TaqMan производства ThermoScientific: ERCC1 (Hs01012155_g1), TOP2a (Hs01032155_g1), ABCB1 (Hs01070648_m1). В качестве гена-рефери была использована 18S (Hs99999901_s1). Нормализованная экспрессия изученных генов, определяемая на амплификаторе CFX96 (BioRad), высчитывалась относительно образцов морфологического неизменённого интактного яичника. ПЦР ставили в триплетах в конечном объёме 12,5 мкл, содержащем 2,5 мкл qPCRmix-HS (ООО «Евроген»), 6,5 мкл деионизованной воды, 1 мкл смеси прямого и обратного праймеров и флуоресцентной метки FAM (зонда) (ThermoScientific), 2,5 мкл кДНК матрицы. Программа амплификации была следующей: 1 цикл 95°C — 5 мин; 45 циклов 95°C — 15 с, 62°C — 30 с, 72°C — 20 с. Снятие флуоресцентного сигнала производилось на зелёном светофильтре (канал FAM) при 62°C .

Анализ безрецидивной и общей выживаемости по Каплан–Майеру проводился с использованием Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали с использованием критерия Cochrane Q-test.

Результаты исследования

В результате проведённых исследований установлено, что у 67% пациентов с асцитной формой РЯ отмечены ранние рецидивы (в течение 6 мес. после прохождения последнего курса ХТ), и средний безрецидивный период составил $88,7 \pm 13,3$ дня. У 33% обследованных не наблюдался рецидив в течение года после последнего курса ХТ. Причём в группе с повышенной экспрессией ERCC1 в эпителиальных клетках асцита больных РЯ среднее значение безрецидивного периода составило $86,5 \pm 14,9$ дня (рис. 1, а), с повышенной экспрессией TOP2a — $92,8 \pm 21,7$ (рис. 1, б), с повышенной экспрессией ABCB1 — $85,6 \pm 33,3$ дня (рис. 1, в).

40% пациентов умерли в течение 1 года наблюдения, период общей выживаемости составил $241,07 \pm 48,8$ дня.

Установлено, что в группе пациентов с ранним рецидивом уровень транскрипта ERCC1 повышен у 71,4% наблюдаемых, TOP2a — у 50%, ABCB1 — у 33% больных. В группе с поздним рецидивом число пациентов с повышенной экспрессией изученных генов практически не различаются (рис. 2).

Анализ выживаемости пациентов с асцитной формой РЯ в зависимости от первичного молекулярно-генетического профилирования эпителиальных клеток асцита показал, что при сниженном уровне транскриптов генов ERCC1, ABCB1 (вероятность такой комбинации 28,9%) доля выживших составляет 72,7% (Cochrane Q-test, $p < 0,157$). При анализе 2 показателей, ответственных за чувствительность к препаратам стандартной ХТ, показано, что снижение транскрипта ERCC1 и повышение транскрипта TOP2a в клетках асцита первичных больных РЯ повышает вероятность выживания в течение 1 года до 75% (встречаемость такой комбинации в выборке — 10,5%). Однако при совместной комбинации (снижение ERCC1 и снижение TOP2a, встречаемость в выборке — 34,2%) доля выживших также достаточно высока и составляет 69,2% ($p < 0,157$). Ситуация, когда снижен ERCC1, а остальные параметры не учиты-

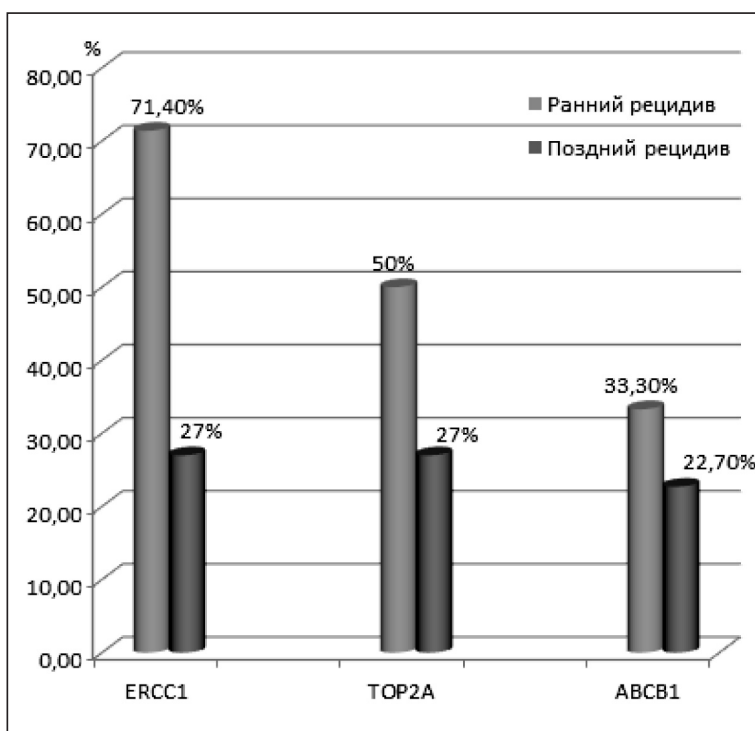


Рис. 2. Число пациентов с повышенным уровнем нормализованной экспрессии генов химиорезистентности в группах с ранним и поздним рецидивом.

ваются, встречается в 44,7% случаев и даёт вероятность выживания 70,5%.

Исследования, посвящённые оценке молекулярной характеристики асцитных форм РЯ немногочисленны. По данным литературы, эпителиальные клетки асцита при РЯ происходят из первичной опухоли, включают субпопуляции стволовых клеток РЯ, чрезмерно экспрессируют основной антиген гистосовместимости I класса, что позволяет им избегать иммунного надзора, повышено инвазивны и резистентны к лекарственным средствам [14, 15]. Клетки асцита при этом изучались в качестве мишени при разработке лекарств для рецидивной асцитной формы РЯ. Определённый интерес представляет работа по профилированию экспрессии miRNAs в асците в

плане корреляции с общей выживаемостью [16]. Полученные нами данные о корреляции уровней генов-маркеров химиорезистентности в клетках асцита с безрецидивной выживаемостью позволяют с высокой степенью вероятности прогнозировать ответ на стандартную ХТ РЯ по схеме AP.

Заключение

Таким образом, для прогнозирования возможного ответа на стандартную ХТ по схеме AP при асцитном РЯ целесообразно оценивать в эпителиальных клетках асцита экспрессию 2 показателей — ERCC1 и ABCB1.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-3196.2018.7)

ЛИТЕРАТУРА

1. Чу Э., Де Вита В. Химиотерапия злокачественных новообразований. М.: Практика; 2008./ Chu E., De Vita V. Khimioterapiya zlokachestvennykh novoobrazovaniy. M.: Praktika; 2008. [in Russian]
2. Liu S.C., Lin H., Huang C.C., Chang Chien C.C., Tsai C.C. et al. Prognostic role of excision repair cross complementing-1 and topoisomerase-1 expression in epithelial ovarian cancer. Taiwan J Obstet Gynecol. 2016; 55 (2): 213–219.
3. Богуш Т.А., Калюжный С.А., Дудко Е.А., Кирсанов В.Ю., Тюляндина А.С., Богуш Е.А. и др. Молекулярные особенности асцитных клеток рака яичников, выявляемых при иммунофлуоресцентном анализе с привлечением проточной цитофлуориметрии. Вестн. Моск. университета. Сер. 2. Химия. — 2016. — Т. 57. — № 5. — С. 330–335. / Bogush T.A., Kaljuzhnyj S.A., Dudko E.A., Kirsanov V.Ju., Tyulyandina A.S., Bogush E.A. i dr. Molekulyarnye osobennosti ascitnykh kletok raka yaichnikov, vyavlyayemykh pri immunofluorescentnom analize s privlecheniem protochnoj citofluorimetrii. Vestn Mosk universiteta. Ser. 2. Khimiya 2016; 57: 5: 330–335. [in Russian]
4. Deloia J.A., Bhagwat N.R., Darcy K.M., Strange M., Tian C., Nuttall K. et al. Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. Gynecol Oncol 2012; 126 (3): 448–454.
5. Cepeda V., Fuentes M.A., Castilla J., Alonso C. Quevedo C., Pérez J.M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. Anticancer Agents Med Chem 2007; 7 (1): 3–18.
6. Arora S., Kothandapani A., Tillison K., Kalman-Maltese V., Patrick S.M. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. DNA Repair (Amst) 2010; 9 (7): 745–753.
7. Goler-Baron V., Assaraf Y.G. Overcoming multidrug resistance via photodestruction of ABCG2-rich extracellular vesicles sequestering photosensitive chemotherapeutics. PLoS One 2012; 7 (4): e35487.
8. Sun Y., Guan Z., Liang L., Cheng Y., Zhou J., Li J., Xu Y. NF-κB signaling plays irreplaceable roles in cisplatin-induced bladder cancer chemoresistance and tumor progression. Int J Oncol 2016; 48 (1): 225–234.
9. Sedláková I., Laco J., Caltová K., Cervinka M., Tošner J., Rezác A., Špaček J. Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer 2015; 25 (2): 236–243.
10. Erriquez J., Becco P., Olivero M., Ponzone R., Maggiorotto F., Ferrero A. et al. TOP2A gene copy gain predicts response of epithelial ovarian cancers to pegylated liposomal doxorubicin: TOP2A as marker of response to PLD in ovarian cancer. Gynecol Oncol 2015; 138 (3): 627–633.
11. Liu S.C., Lin H., Huang C.C., Chang Chien C.C., Tsai C.C., Ou Y.C. et al. Prognostic role of excision repair cross complementing-1 and topoisomerase-1 expression in epithelial ovarian cancer. Taiwan J Obstet Gynecol 2016; 55 (2): 213–219.
12. Казанцева П.В., Цыганов М.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Ибрагимова М.К. и др. Молекулярно-генетические маркеры эффективности неoadъювантной химиотерапии с применением антрациклинов у больных раком молочной железы. Сибирский онкологический журнал. — 2016. — Т. 15. — № 2. — С. 29–35. / Kazanceva P.V., Cyganov M.M., Slonimskaya E.M., Litvyakov N.V., Cherdynceva N.V., Ibragimova M.K. i dr. Molekulyarno-geneticheskie markery effektivnosti neoadjyuvantnoj khimioterapii s primeneniem antratsiklinov u bol'nykh rakom molochnoj zhelezy. Sibirskij onkologicheskij zhurnal 2016; 15: 2: 29–35. [in Russian]
13. Lu D., Shi H.C., Wang Z.X., Gu X.W., Zeng Y.J. Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma. Br J Biomed Sci 2011; 68 (2): 69–74.
14. Sarkar S., Malekshah O.M., Nomani A., Patel N., Hatefi A. A novel chemotherapeutic protocol for peritoneal metastasis and inhibition of relapse in drug resistant ovarian cancer. Cancer Med 2018 Jun 21.
15. Akhter M.Z., Sharawat S.K., Kumar V., Kochat V., Equbal Z., Ramakrishnan M. et al. Aggressive serous epithelial ovarian cancer is potentially propagated by EpCAM+CD45+ phenotype. Oncogene 2018; 37 (16): 2089–2103.
16. Závěská L., Jandáková E., Weinberger V., Minar L., Hanzlíková V., Dušková D. et al. Extracellular microRNAs as Potential Biomarkers for Ovarian Cancer. Reprod Sci. 2018 Jan 1; 1933719118776808.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Долгова Динара Ришатовна — к. б. н., доцент кафедры физиологии и патофизиологии медицинского факультета, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Генинг Татьяна Петровна — д. б. н., профессор зав.каф. физиологии и патофизиологии медицинского факультета, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Абакумова Татьяна Владимировна — к. б. н., доцент кафедры физиологии и патофизиологии медицинского факультета, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Генинг Снежанна Олеговна — аспирант каф. онкологии и лучевой диагностики медицинского факультета, ФГБОУ

ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Антонеева Инна Ивановна — д. м. н., профессор каф. онкологии и лучевой диагностики медицинского факультета, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Песков Андрей Борисович — д. м. н., профессор каф. последипломного образования и семейной медицины, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Федотова Антонина Юрьевна — инженер-исследователь Научно-исследовательского медико-биологического центра, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг.

И. А. ЦВЕТКОВА^{1}, С. С. БЕЛАНОВ^{2*}, В. В. ГОСТЕВ^{1,3*}, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ^{1*}, М. О. ВОЛКОВА^{1*}, А. С. МОХОВ^{4*}, Е. В. НИКИТИНА¹, Е. Л. КАЛИСНИКОВА¹, К. А. ИВАНОВА¹, А. А. ВОЛОДИНА⁵, С. В. СИДОРЕНКО^{1,3}

¹ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

² Университет Хельсинки, Институт биотехнологии, Хельсинки, Финляндия

³ Северо-западный государственный медицинский университет, Санкт-Петербург

⁴ Санкт-Петербургский информационно-аналитический центр, Санкт-Петербург

⁵ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Clonality of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Russia, Circulating from 1980 to 2017

*I. A. TSVETKOVA¹, S. S. BELANOV², V. V. GOSTEV^{1,3}, O. S. KALINOGORSKAYA¹, M. O. VOLKOVA¹, A. S. MOKHOV⁴, E. V. NIKITINA¹, E. L. KALISNIKOVA¹, K. A. IVANOVA¹, A. A. VOLODINA⁵, S. V. SIDORENKO^{1,3}

¹ Federal State-Financed Institution Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg

² University of Helsinki, Institute of Biotechnology, Helsinki, Finland

³ North-Western State Medical University, Saint-Petersburg

⁴ The Saint-Petersburg Information and Analytical Centre, Saint-Petersburg

⁵ The Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg

Цель исследования — охарактеризовать популяцию *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России, выявить внутривидовую филогенетическую связь между штаммами пневмококков из разных географических мест. **Материал и методы.** Филогенетический анализ был проведён с помощью eBURST-анализа, а также анализа конкатенатов последовательностей шести генов домашнего хозяйства, используемых для мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). **Результаты.** Циркулирующие в России штаммы пневмококка, описанные в этом исследовании, связаны со многими успешными международными клонами, обладающими потенциалом для распространения. Выявлена тенденция к преимущественному распространению в России антибиотикорезистентности среди отдельных генетических линий.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, филогенетический анализ, антибиотикорезистентность.

The objective of this study was to clarify the intraspecies phylogenetic relationship between pneumococci strains from various geographical locations. Concatenated Multilocus sequence typing (MLST) sequences of six housekeeping genes were chosen for the phylogenetic tree construction. Trees, constructed for concatenated genes, revealed that there is a tendency for a clonal spread of antibiotic resistance. Interestingly, the isolates with novel or circulating mainly in Russia genotypes, described in this study, many are related to successful international clones, with the potential to spread.

Keyword: *Streptococcus pneumoniae*, phylogenetic relationship, antibiotic resistance.

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), пневмококковая инфекция (ПИ) является распространённой причиной заболеваемости и смертности во всем мире [1]. Проблемы эпидемиологического надзора и истинного уровня заболеваемости ПИ в России до сих пор являются актуальными [2]. В разные периоды времени в России были проведены широкомасштабные исследования роли пневмококковой инфек-

ции в структуре бактериальных инфекций у детей [3–6]. Согласно этим исследованиям, средняя заболеваемость менингитом пневмококковой этиологии в России составляет 8 на 100 тыс. детей в возрасте до 5 лет [3, 4]. Бактериальная природа острого среднего отита (ОСО) у детей в возрасте до 5 лет была подтверждена в 47% случаев, при этом в 35,3% случаев в качестве возбудителя ОСО был выявлен пневмококк [5, 6].

До введения пневмококковых конъюгированных вакцин в Национальную программу иммунизации Российской Федерации в России также были проведены многочисленные эпидемиологические исследования по оценке распределения серотипового состава *Streptococcus pneumoniae*, цир-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: e-mail: i.tsvetik@gmail.com

* Авторы с равным вкладом в опубликованную работу

кулирующих среди детей. Установлено, что наиболее распространёнными оказались серотипы 6B, 14, 19F и 23F [3, 7–20]. Серотип 3 часто ассоциировался с ОСО. Сниженная антибиотикочувствительность была в основном характерна для изолятов серотипов 19A, 19F, 14, 6B и 23F [7, 11, 13]. Серотипы 6A и 19A часто ассоциировались с высокой устойчивостью к антибиотикам.

Опыт иммунизации детей против *S. pneumoniae* в других странах показал эффективность применения вакцинопрофилактики для снижения распространённости инвазивных пневмококковых заболеваний [21–24]. В России 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина (PCV13) была введена в Национальную программу иммунизации только в 2014 г. Однако, несмотря на высокий уровень охвата иммунизацией в большинстве регионов (87%), достигнутый за прошедший период после введения плановой вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции, большинство детей (73%) были привиты без соблюдения стандартной схемы [25]. Это затрудняет оценку эффективности вакцинации.

Для оценки эффективности вакцинации необходимо проводить мониторинг динамики пневмококковой популяции. Реакция пневмококковой популяции на селективное давление, вызванное вакцинацией, может быть связана как с увеличением частоты ПИ с замещением серотипов [26, 27], так и с появлением устойчивости к антибиотикам у не-PCV13 штаммов [27]. Понимание популяционной генетики пневмококков позволит выявить изменения, происходящие на уровне генетических линий циркулирующих пневмококков. До недавнего времени в России не проводилось глобальной оценки распространённости генетических линий пневмококка.

По данным pubMLST [28], более половины пневмококковой популяции в России представлено штаммами, относящимися к редким сиквенс-типам. Поэтому знание филогенетических взаимосвязей между циркулирующими в России штаммами пневмококков и распространёнными в различных географических регионах эпидемически значимыми клонами важно для понимания эпидемиологической ситуации в России. Мы проанализировали популяцию пневмококков в России за период с 1980 по 2017 гг, включая ранний период после начала вакцинации. Мы провели филогенетический анализ для 516 штаммов пневмококка из России, зарегистрированных в базе данных PubMLST. Данная выборка также включает штаммы, выделенные и типированные в нашем исследовательском центре. Мы также оценили наличие ассоциаций между сниженной антибиотикочувствительностью и принадлежностью к генетическим линиям среди пневмококков, циркулирующих в России.

Материал и методы

Характеристика изолятов в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург). Изоляты *S. pneumoniae* были получены от пациентов с инвазивными и неинвазивными пневмококковыми заболеваниями, а также от носителей из различных регионов России за 2010–2017 годы. Скрининг 976 изолятов на антибиотикочувствительность к пенициллину (PEN) и эритромицину (ERY) был проведён с использованием диско-диффузионного метода и рекомендаций EUCAST. ПЦР-серотипирование изолятов было выполнено с учётом рекомендаций CDC. Для MLST-типирования было отобрано 126 изолятов, включающих как PEN-резистентные, так и PEN-чувствительные пневмококки, принадлежащие либо к распространённым в России, либо редким серотипам.

Мультилокусное секвенирование (MLST-типирование). MLST-типирование и идентификация сиквенс-типов были проведены в соответствии с рекомендациями pubMLST (<https://pubmlst.org/>). Принадлежность сиквенс-типов к клональным комплексам (для однолокусных вариантов) была установлена с помощью eBURST анализа.

Формирование выборки для анализа. Анализируемая выборка была увеличена за счёт включения в исследование изолятов из России и референтных штаммов из других регионов, зарегистрированных в базе данных PubMLST (см. Результаты и обсуждение).

Филогенетический анализ. Филогенетический анализ был выполнен по конкатенатам последовательностей генов MLST (953 изолята с метаданными, 338 сиквенс-типов).

Выравнивание последовательностей. Конкатенаты последовательностей фрагментов шести из семи генов домашнего хозяйства (за исключением гена *ddl*) были выровнены с помощью программы Parsnp, версия 1.2. [29, 30]. Идентичные последовательности тех же сиквенс-типов, но соответствующие разным штаммам были добавлены в выравнивание для анализа метаданных.

Анализ структуры популяции. 416 сайтов однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) были экстрагированы с помощью пакета Parsnp для построения филогенетического дерева в программе RaxML, версия 8.2.12. [31] с использованием стандартной модели эволюции GTR (General Time-Reversible) замены нуклеотидов с четырьмя категориями для учёта гетерогенности скорости эволюции сайтов согласно гамма распределению, с выполнением 100 бутстрэп реплик [31]. Результирующее дерево было обработано по алгоритму укоренения в среднюю точку (midpoint rooting) относительно самой длинной ветви. Аннотация филогенетического дерева с использованием различных метаданных была выполнена в программе iTOL, версия 4.3.2. [32]. То же самое выравнивание SNPs было проанализировано в программном пакете RhierBAPS (R версия 3.5.2, RhierBAPS пакет версии 1.1.0) для анализа взаимосвязей между генетическими кластерами и их субструктурами [33, 34]. Программа SplitsTree (версия 4.14.8) была использована для получения филогении по методу ближайшего соседа (neighbor joining, NJ) с выполнением 100 бутстрэп реплик, с применением алгоритма split decomposition (SD) [35]. Последовательности родственного вида *Streptococcus mitis* были использованы в качестве аутгруппы.

Попарные оценки генетических расстояний между идентифицированными в популяции группами. Генетическая дифференциация между филогенетическимикладами была проведена с помощью анализа генетических расстояний с использованием R-пакета и скрипта для попарной оценки расстояний по SNP [36].

Результаты и обсуждение

Анализируемая выборка. В данное исследование были включены зарегистрированные в базе данных PubMLST штаммы *S. pneumoniae* ($n=516$),

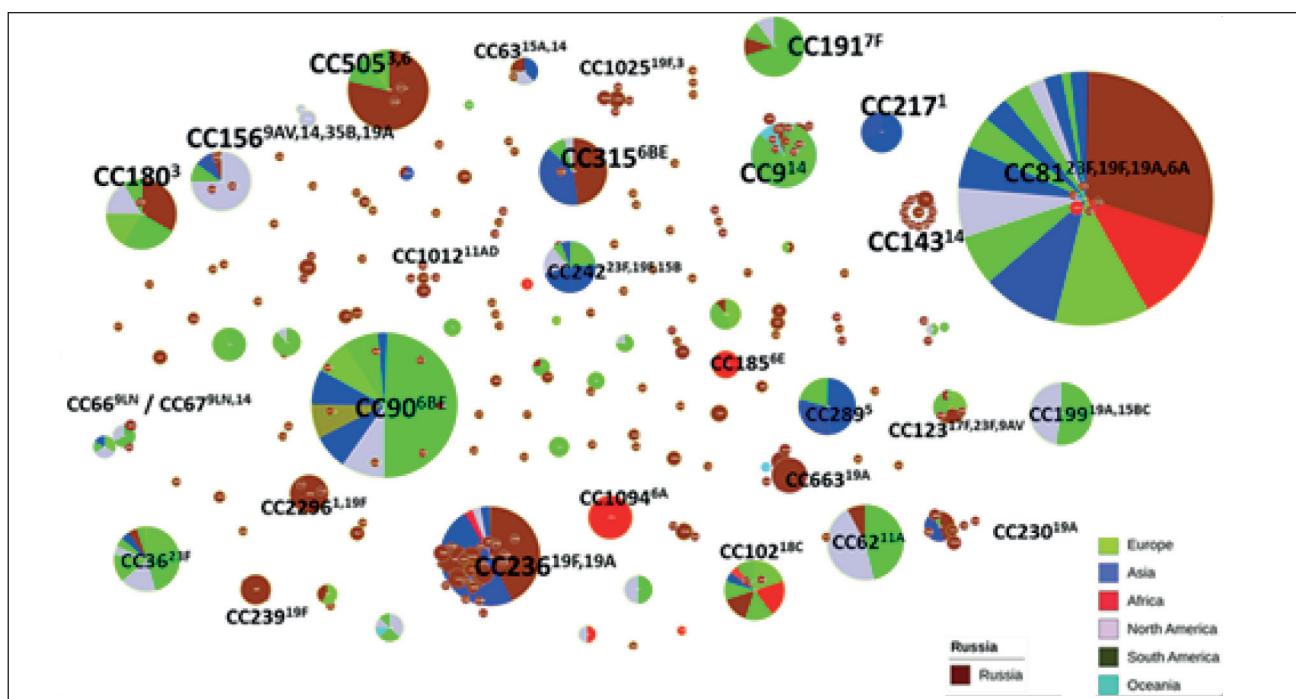


Рис. 1. eBURST анализ анализируемой выборки *Streptococcus pneumoniae*.

Клональные комплексы представлены SLVs. Штаммы *S. pneumoniae* из России отмечены коричневым цветом.

выделенные в период с 1980 по 2017 гг. в различных городах России (Анадырь, Архангельск, Челябинск, Екатеринбург, Иркутск, Хабаровский край, Красноярск, Москва, Нижний Новгород, Новокузнецк, Пермь, Санкт-Петербург, Смоленск, Томск, Владивосток, Ярославль); референтные штаммы *S. pneumoniae* из других регионов мира ($n=437$), выделенные в различные периоды времени, принадлежащие аналогичным сиквенс-типам или эпидемически значимым генетическим линиям. Метаданные, доступные для изолятов, включали: год выделения, источник (кровь, ликвор, жидкость среднего уха, мокрота, носоглотка), географический регион, серотип, сиквенс-тип, данные антибиотикочувствительности.

Оценка популяции *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России. Анализ нашей выборки с помощью стандартного eBURST алгоритма позволил сгруппировать близкие генетические линии, представленные однолокусными вариантами (single locus variants, SLVs). Наиболее распространёнными в России клональными группами, в период с 1980 по 2017 гг., были: CC81, CC236, CC505, CC180, CC315, CC239, CC663, CC230, CC143, CC1025, CC2296 (рис. 1). Распространённые клональные группы ассоциировались с вакцинными серотипами: 19F, 23F, 19A, 14, 3 и 6-й серогруппой. Однако большая часть пневмококковой популяции в России была представлена редкими сиквенс-типами, филогенетические связи которых не могут быть проанализированы с помощью eBURST-алгоритма.

Генетическая структура популяции *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России. Для более детального установления родственных взаимосвязей был проведён филогенетический анализ по данным о последовательностях консервативных генов домашнего хозяйства, используемых для MLST-типирования. Филогенетическое дерево было сконструировано с использованием 416 SNP в конкатенатах последовательностей аллелей 6 из 7 генов домашнего хозяйства: *recP*, *gki*, *gdh*, *aroE*, *spi*, *xpt*. Ген *ddl*, кодирующий D-аланил-D-аланин лигазу, участвующую в биосинтезе пептидогликана и формировании клеточной стенки, был исключён из анализа вследствие своей вариативности. Известно, что аллели гена *ddl* резистентных к пенициллину пневмококков содержат сайты рекомбинации, полученные от других видов стрептококков [37].

Филогенетическое дерево, отражающее взаимосвязи между изолятами, было построено с помощью программного пакета RaxML, использующего метод максимального правдоподобия (см. рис. 2). Сиквенс-кластеры были идентифицированы с помощью R-пакета ghierbaps, алгоритм которого основан на реализации байесовского подхода для интерпретации вероятности. В результате популяция пневмококков, циркулирующих в России, была разделена на одиннадцать сиквенс-кластеров (SC2-SC12; SC1 соответствовал последовательностям штаммов *Streptococcus mitis*) (см. рис. 2).

Наиболее распространёнными генетическими линиями пневмококков, циркулирующих в России, начиная с 2001 г., являлись линии, соот-

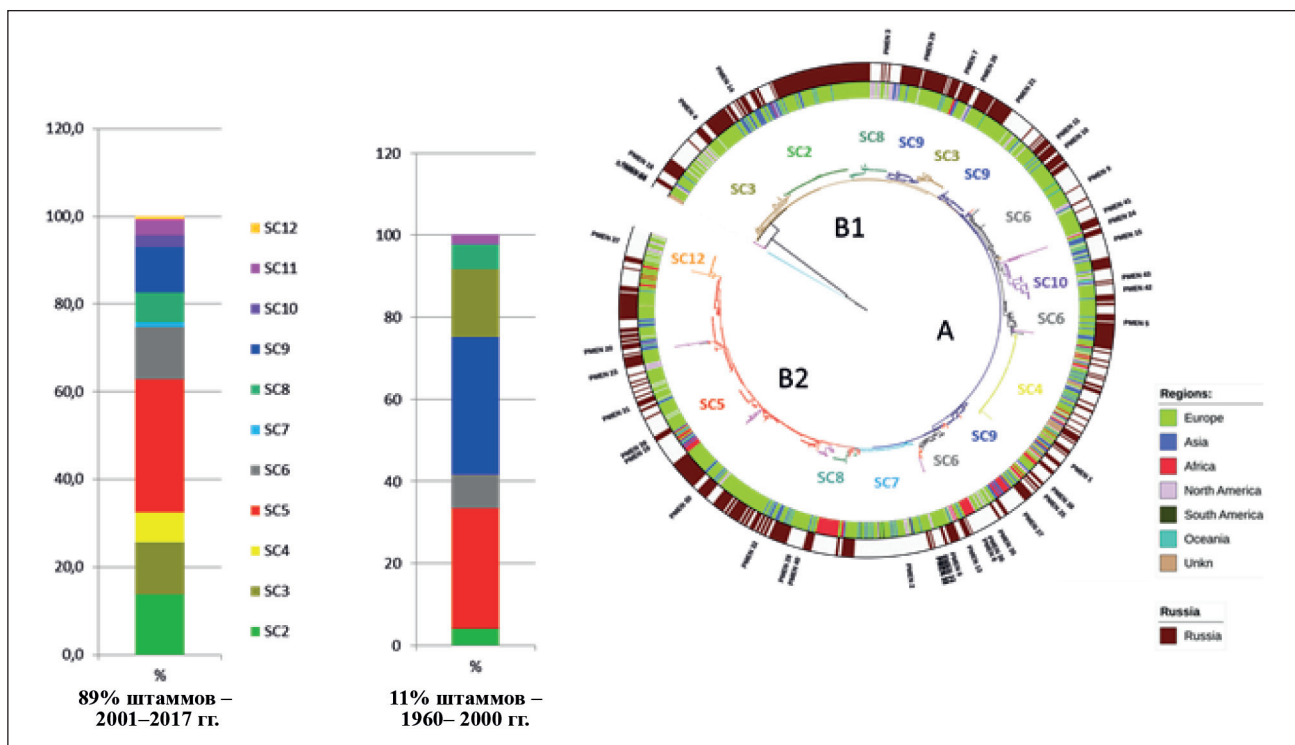


Рис. 2. Филогенетическое дерево *Streptococcus pneumoniae* по конкатенатам 6 генов домашнего хозяйства — Метод максимального правдоподобия (RaXML).

S. mitis KCOM13 используется в качестве аутгруппы. Сиквенс-кластеры (SC) идентифицированы с помощью пакета ghierbaps. Аннотации выполнены в программе iTOL. Российские изоляты показаны коричневым цветом. География регионов мира, в том числе азиатская и европейская части России, отражена цветами во внутреннем кольце области аннотаций. A, B1 B2 — расположение глобальных групп, выделенных с помощью Splits Tree (рис. 3).

ветствующие сиквенс-кластерам: SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC8 и SC9 (7 из 11 идентифицированных сиквенс-кластеров) (рис. 2). Распространённые в России сиквенс-типы (согласно eBURST анализу) ассоциировались со следующими сиквенс-кластерами: SC2 (ST236, ST271, ST320 и SLVs); SC3 (ST663); SC4 (ST81 и SLVs); SC5 (ST180, ST505, ST230, ST315, ST1025); SC8 (ST143); SC9 (ST239, ST2296).

Российские представители SC4 включали изоляты сиквенс-типа ST81 и его SLVs. Референсный клон Spain23F-1, PMEN-1, принадлежащий данному сиквенс-типу, впервые был зарегистрирован в 1980 годах в Испании. Начиная с 1991 г. и до массового внедрения вакцинации, было зарегистрировано межконтинентальное распространение представителей PMEN-1 в различных странах [38], в том числе и в России. В 1990 годах представители PMEN-1 составляли 40% циркулирующих в США штаммов со сниженной чувствительностью к пенициллину, распространение данного клона снизилось после введения конъюгированной вакцины PCV7 [39, 40].

Сиквенс-кластер SC6 был представлен несколькими кладами и включал референсные последовательности девяти эпидемически значимых клонов: PMEN-8 и PMEN-13 (Южная Африка), PMEN-35 и PMEN-36 (Нидерланды),

PMEN-5 (Испания), PMEN-11 и PMEN-10 (Чешская Республика), PMEN-9 (Великобритания), PMEN-41 (Португалия). Много представителей российских штаммов, циркулирующих в различные временные периоды и принадлежащих редким сиквенс-типам, кластеризовались с клонами PMEN-5, PMEN-13, PMEN-10 и PMEN-11 (см. рис. 2). В состав SC6 входил ST123, принадлежащие к нему изоляты были зарегистрированы в наиболее ранний из анализируемых периодов, в 1939 г. в Дании. Среди российских штаммов также были штаммы, принадлежащие ST123 (выделены в 2007 г.).

SC10 был представлен полифилетическим кладами, включающим представителей PMEN-15 (Taiwan23F-15), PMEN-42 (NorwayNT-42), PMEN-43 (USANT-43), циркулирующих в различных регионах мира: Азия, Европа и Северная Америка, соответственно (см. рис. 2).

Представители SC9 формировали несколько клады (см. рис. 2). Распространённые в России представители SC9 принадлежали ST2296 (1, 19F) и ST239 (23F, 19F). Изоляты, принадлежащие ST2296, были выделены в период с 1960 по 2000 гг. (см. рис. 2). Редкие сиквенс-типы кластеризовались вместе с циркулирующими в Европе PMEN-38 (Sweden4-38, ST205), повсеместно циркулирующим PMEN-25 (Sweden15A-25, ST63) и распро-

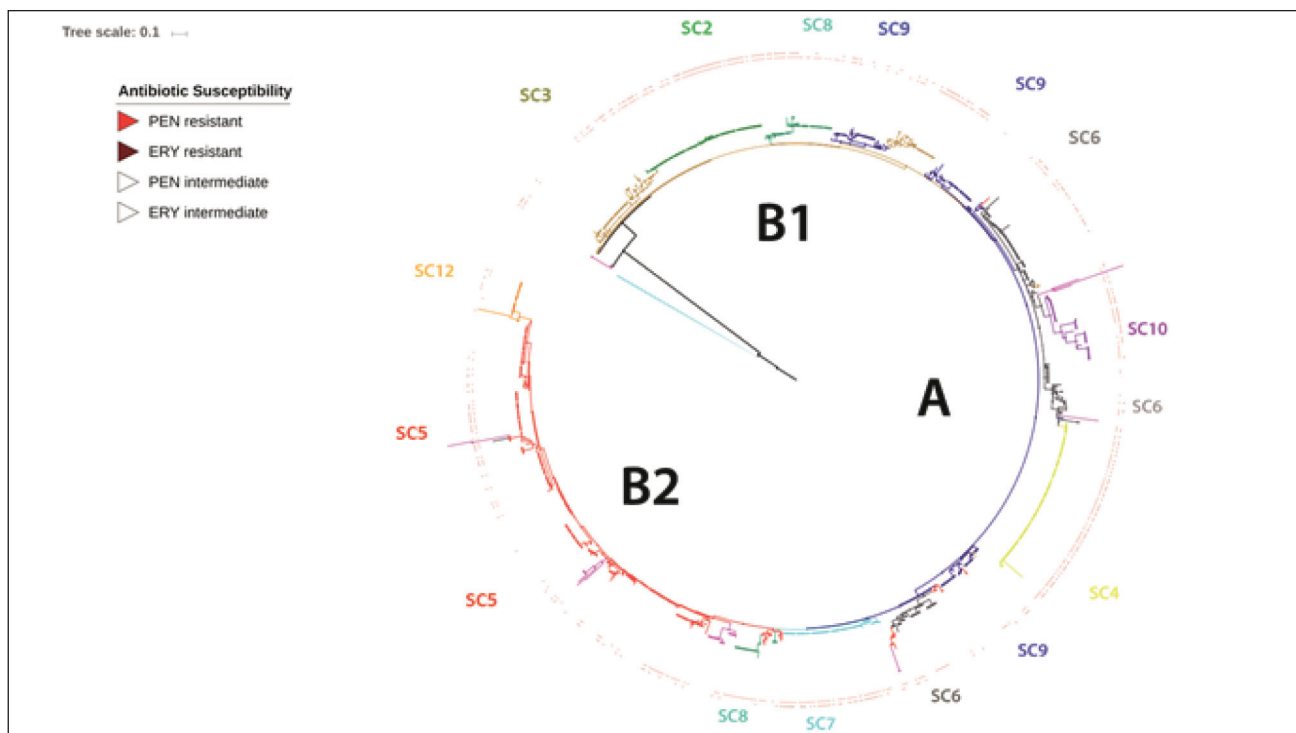


Рис. 3. Ассоциация сниженной антибиотикочувствительности и генетическими линиями популяции *Streptococcus pneumoniae*.

Сиквенс-кластеры (SC) идентифицированы с помощью R-пакета rhierbaps. Изоляты со сниженной чувствительностью к бета-лактамам и макролидам отмечены треугольниками.

странённым в Азии и Африке PMEN-27 (Sweden1-27, ST217).

Представители SC8 формировали два клада, один из которых был ассоциирован с повсеместно распространённым клоном PMEN-3 (Spain9V-3, ST156), а второй — с сиквенс-типом ST1094, распространённым в Африке в период с 1960 по 2000 гг.

SC2 был представлен широко распространёнными в России (азиатской и европейской части) и Азиатских странах изолятами, кластеризующимися вместе с референсным клоном PMEN14 (Taiwan19F-14, ST236). Данный клад также включал близкие ему ST271, ST320 и их однолокусные и двулокусные варианты.

SC3 представлен распространённым в Европе и Северной Америке ST62, ST67, а также российскими штаммами редких сиквенс-типов.

Анализ данных (рис. 3) выявил тенденцию к преимущественному распространению в России антибиотикорезистентности в отдельных сиквенс-кластерах: SC2 (серотипы 19F, 19A) — 21% изолятов, устойчивых к бета-лактамам; и SC4 (серотип 23F) — 12,3%. Циркулирующие в России представители сиквенс-кластеров SC8 и SC9 также несли детерминанты резистентности к бета-лактамам и макролидам: SC8 (серотипы 14, 19A, 9A/V) — 9,9%, SC9 (серотипы 19F, 19A, 14, 6 серогруппа, 9A/V, 3, 1, 4) — 8,3%. Изоляты SC6 (серотипы 14, 19F, 19A) составляли 6% устойчивых к бета-лактамам штаммов (данные штаммы были

преимущественно представлены ST423, а также редкими сиквенс-типами, в том числе изолятами ST123, 23F). Сиквенс-кластер SC5 включал только один сиквенс-тип (ST315), который устойчиво ассоциировался с наличием мультирезистентности к бета-лактамам и макролидам (см. рис. 3). Практически все представители клада, ассоциированного с SC10, несли детерминанты резистентности к бета-лактамам и макролидам. Большая часть российских штаммов из данного клада формировала отдельный субклад из резистентных к бета-лактамам (2,4%) и макролидам представителей ST10434 (19A), ST10435 (19A), ST880 (NT).

Структура глобальной популяции *Streptococcus pneumoniae*. Для подтверждения полученной топологии филогенетического дерева (см. рис. 2) те же 416 сайтов SNPs, экстрагированные из выравнивания конкатенатов MLST-аллелей, были использованы для построения филогении с помощью альтернативного метода — с объединением алгоритмов ближайших соседей и максимальной парсимонии (программа SplitsTree), и применением алгоритма splits decomposition. Данный анализ позволил выделить два глобальных кластера в пределах популяции *S. pneumoniae* (A и B) (см. рис. 4), при этом в кластере B также можно было выделить группы B1 и B2 (см. рис. 4).

Глобальные группы A и B включали представителей различных сиквенс-кластеров: A — SC4, SC6, SC10; B — SC5, SC7, SC8, SC9, SC12 (см. рис. 2).

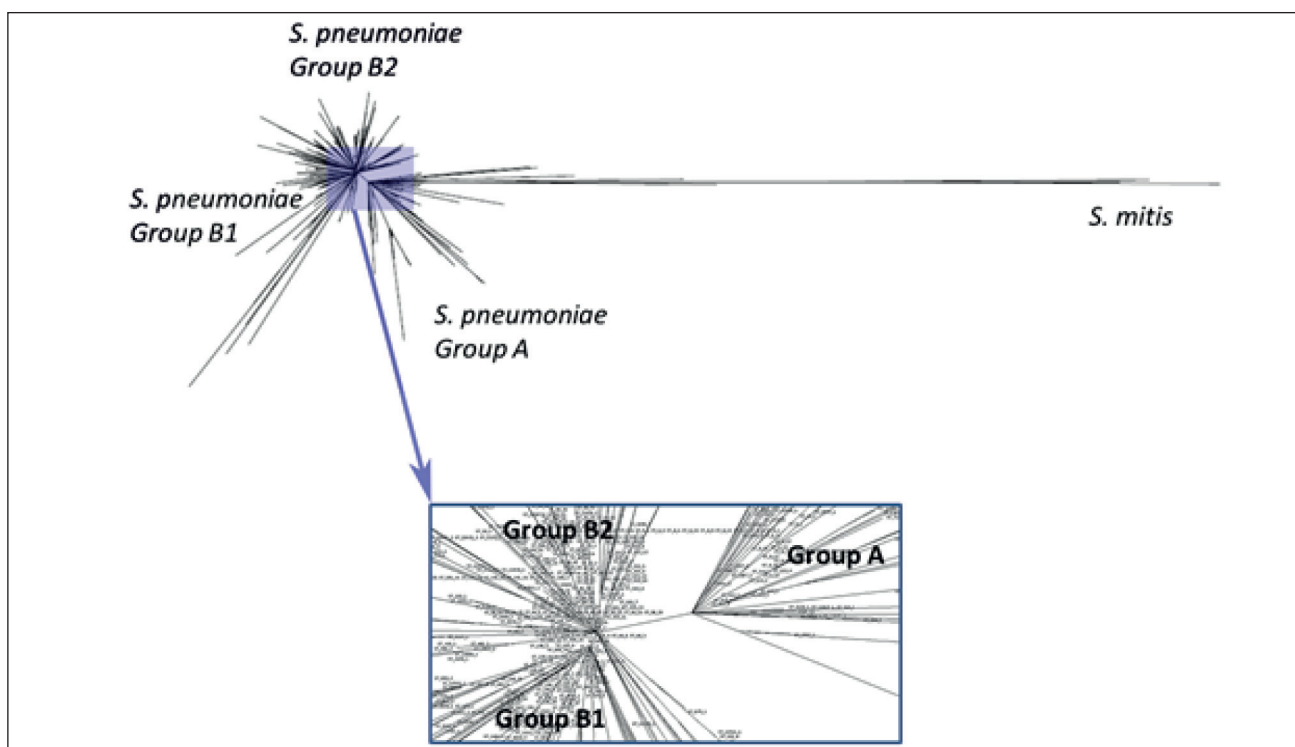


Рис. 4. Филогенетическое дерево *Streptococcus pneumoniae* по конкатенатам 6 генов домашнего хозяйства — объединение методов ближайших соседей и максимальной парсимонии (программа SplitsTree). *S.mitis* KCOM13 используется в качестве аутгруппы.

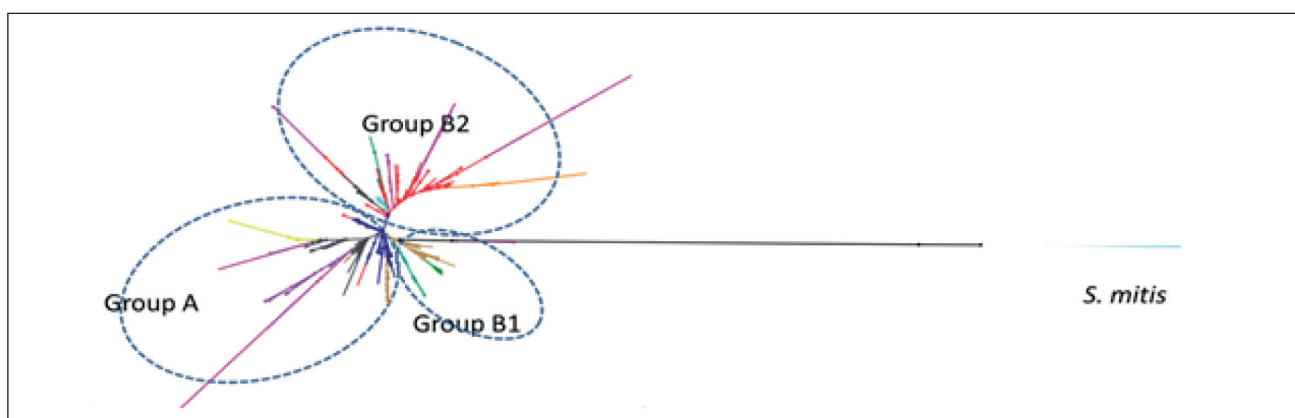


Рис. 5. Филогенетическое дерево *Streptococcus pneumoniae* по конкатенатам 6 генов домашнего хозяйства — метод максимального правдоподобия (RaxML).

Сиквентс-кластеры идентифицированы с помощью пакета R-пакета rhierbaps. Группы A и B1 имеют альтернативную топологию относительно *S.mitis*, по сравнению с представленной на рис. 4. Представители SC11 показаны сиреневым цветом.

Исключение составляли изоляты SC11, объединяющего филогенетически далекие друг от друга сиквентс-типы (рис. 2, 5). Данный артефакт известен в филогенетике как «эффект притяжения длинных ветвей» (long branch attraction, LBA) — форма систематической ошибки, при которой отдалённо связанные родословные неверно выводятся как тесно связанные [41]. Другое отличие заключалось в альтернативной топологии клада B1 относительно *S.mitis* KCOM13 при использовании разных мето-

дов. Возможно, погрешность в оценке генетических дистанций между группами A, B1 и *S.mitis* KCOM13 связана с анализом насыщенного мутациями выравнивания, обусловленного введением *S.mitis* KCOM13 в качестве аутгруппы, и разными эволюционными моделями, лежащими в основе используемых методов.

Дифференциация между группами A, B1 и B2 была проведена с помощью анализа различий внутри- и межгрупповых средних генетических рас-

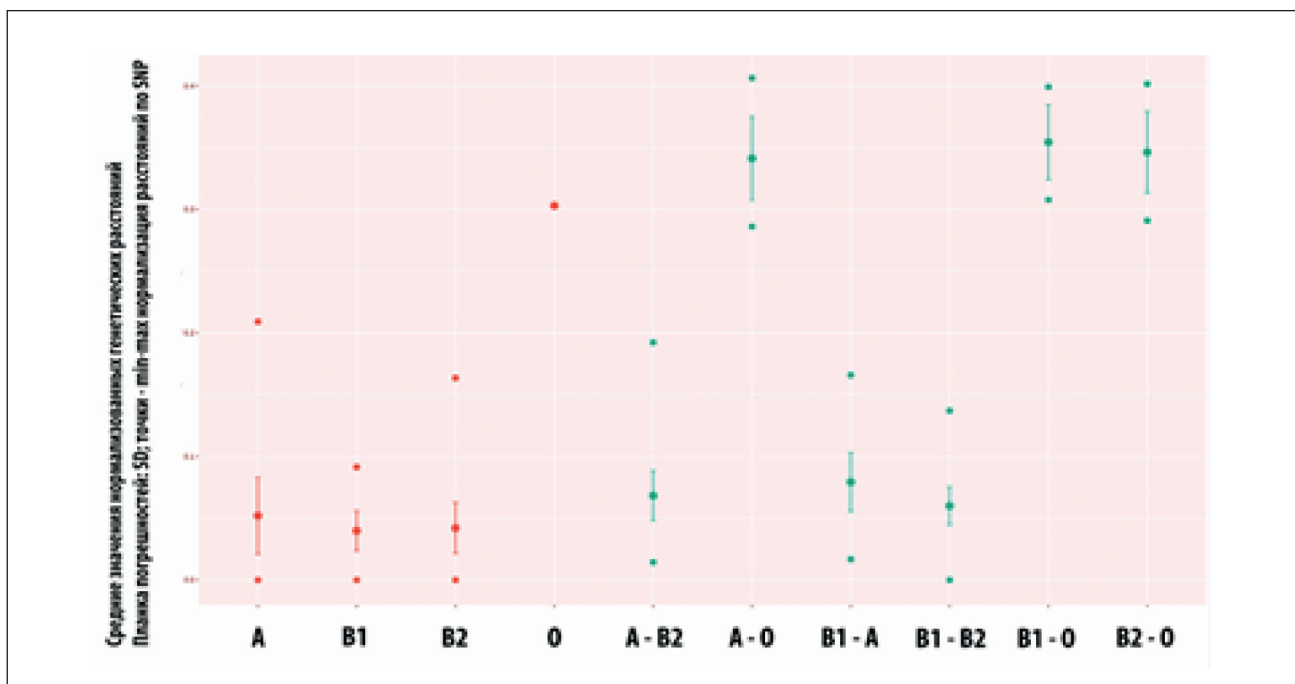


Рис. 6. Попарные оценки генетических расстояний для групп А, В1 и В2.

Красным и синим цветом показаны внутригрупповые и межгрупповые оценки, соответственно. Приведены стандартизованные значения генетических расстояний после min—max нормализации. А, В1 и В2 — группы *S.pneumoniae*, соответствующие трём глобальным кладам на филогенетическом дереве на рис. 2 и рис. 3. Группа О — аутигруппа, представленная тремя штаммами *S.mitis*.

стояний, рассчитанных по матрице попарных расстояний, вычисленных по SNP. Внутригрупповые диапазоны стандартизованных значений генетических расстояний для групп В1 и В2 практически не перекрывались с межгрупповыми диапазонами для всех групп (рис. 6). Более широкий диапазон генетических расстояний внутри группы А частично перекрывался с диапазонами между группами, что отражало большую степень дивергенции между изолятами группы А. Однако средние значения генетических расстояний между группой А и группами В1 и В2 выше среднего внутригруппового значения для А. Вариабельность изолятов между группами В1 и В2, меньше, чем между представителями группы В и группы А (см. рис. 6). Таким образом, изоляты, входящие в состав группы В1 и В2, генетически ближе друг к другу, чем к изолятам группы А (см. рис. 6). Результаты, полученные на основании анализа расстояний, рассчитанных по SNPs core-генома, имели ту же тенденцию и прослеживался тот же характер генетических взаимосвязей между изолятами трёх глобальных групп, однако данные по core-геному были доступны только для субвыборки и недостаточны для полноценного анализа (результаты не показаны). Полученные результаты согласуются с топологией глобальных групп А, В1 и В2 в филогенетическом дереве, построенном с помощью программы Splits Tree.

Субструктура кладов и топология групп А, В1 и В2 были также подтверждены анализом генетичес-

ких расстояний между сиквенс-кластерами (рис. 7). Некоторые сиквенс-кластеры соответствовали монофилетическим кладам (см. рис. 2), представленным изолятами близких сиквенс-типов, в частности: SC2 (ST236, ST271, ST320, а также их SLVs), SC3 (ST62 и ST53), SC4 (ST81 и SLVs), SC7 (ST90, ST 238, ST384). Сиквенс-кластеры SC2 и SC3 входили в состав одного клада В1 в филогенетических деревьях (см. рис. 2, 4). Расположение кладов SC2 и SC3, а также близкородственные связи внутри монофилетических кладов согласовались с результатами попарной оценки генетических расстояний (рис. 7). На рис. 7 прямой линией выделены минимальные средние значения генетических расстояний, соответствующие наиболее близким сиквенс-кластерам. При этом SC2-SC3, SC2-SC9, SC2-SC8, SC3-SC8, SC3-SC9 соответствуют группе В1; SC5-SC7, SC5-SC8, SC5-SC9, SC6-SC7, SC6-SC9, SC7-SC8, SC7-SC9, SC8-SC9 соответствуют группе В2. Представители SC8 и SC9 поделились между группами В1 и В2, что свидетельствовало о более близком родстве групп В1 и В2. Другими близкими друг к другу сиквенс-кластерами между группами В1 и В2 являются SC3-SC7. Сиквенс-кластеры, входящие в состав клада А (SC4, SC6 и SC10), находились на более отдалённом генетическом расстоянии от сиквенс-кластеров, входящих в состав групп В1 и В2 (см. рис. 2, 7). Похожая тенденция прослеживалась по результатам анализа core-генома (данные не показаны).

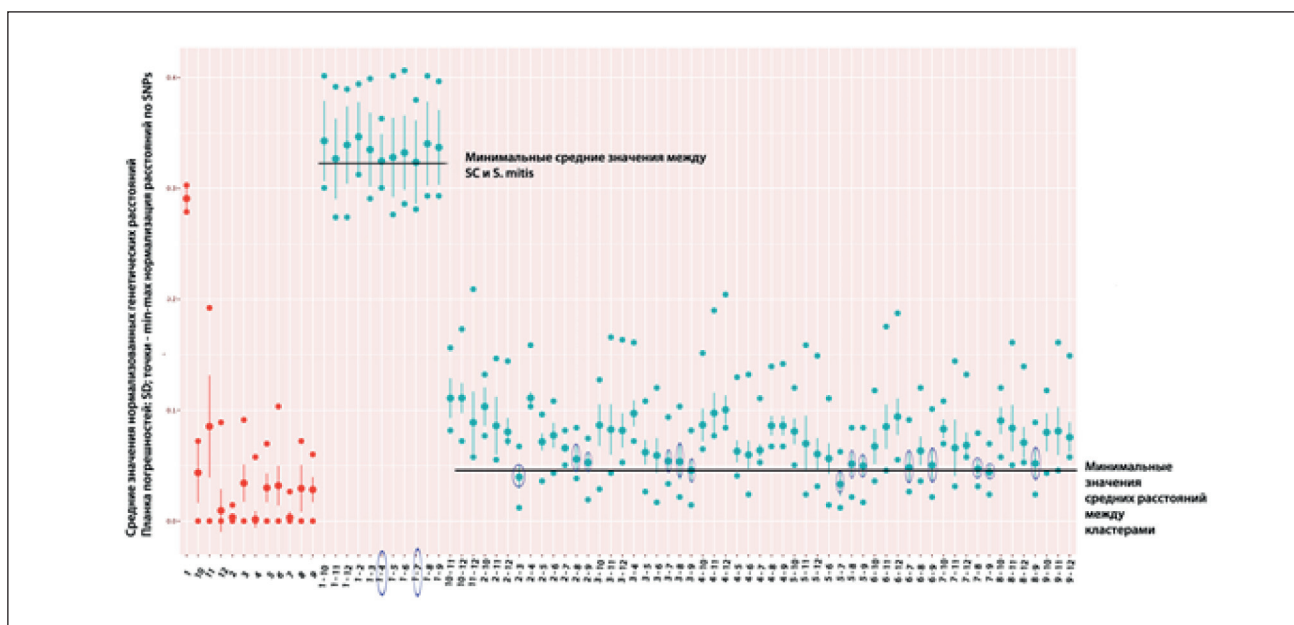


Рис. 7. Попарные оценки генетических расстояний для сиквент-кластеров SCs 1–12, рассчитанные по SNPs конкатенатов последовательностей генов MLST.

Красным и синим цветом показаны внутригрупповые и межгрупповые оценки, соответственно. Приведены стандартизованные значения генетических расстояний после min–max нормализации. Прямой линией выделены минимальные средние значения нормализованных расстояний между группами: между сиквент-кластерами пневмококка (снизу) и между сиквент-кластерами пневмококка и SC1, включающего представителей *S. mitis*.

Таким образом, поскольку популяция *S. pneumoniae* близка к панмиктической, установить истинные филогенетические взаимосвязи между отдалёнными сиквент-типами может быть трудно. Тем не менее, наблюдается общая тенденция для взаимосвязей между изолятами *S. pneumoniae* анализируемой выборки как по данным SNP генов MLST, так и по SNP core-генома. Следовательно, филогенетическое дерево, отражающее деление популяции на три глобальные группы, можно считать видовым деревом.

Заключение

Для характеристики популяции *S. pneumoniae*, циркулирующих в России, помимо eBURST-анализа, мы использовали дополнительные методы, которые позволили получить новую информацию. Удалось установить филогенетические взаимосвязи для редких сиквент-типов, которыми представлена более половины популяции пневмококков в России. Благодаря этому была полу-

чена связанная филогенетическая картина. Изоляты, циркулирующие в России, связаны с большинством выявленных генетических линий. Выявлена тенденция к преимущественному распространению в России антибиотикорезистентности среди отдельных сиквент-кластеров — SC2, SC4. Установлена взаимосвязь циркулирующих в России генетических линий с распространёнными в различное время в разных регионах эпидемически значимыми клонами. Установлено деление глобальной популяции пневмококков на 3 группы. Был проведён анализ взаимосвязей между глобальными группами A, B1 и B2 и их субструктурами (кладами дерева и ассоциирующимися с ними сиквент-кластерами). Были выявлены и охарактеризованы 11 сиквент-кластеров.

Знание особенностей генетических линий пневмококка, циркулирующих на территории России «до начала вакцинации» позволит в будущем оценивать влияние антипневмококковых вакцин на популяцию пневмококка.

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization. Pneumococcal disease. Доступно на: <https://www.who.int/immunization/diseases/pneumococcal/en/>.
- Брико Н.И. Бремя пневмококковых инфекций и направления совершенствования эпидемиологического надзора в России. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013; 6: 4–9. / Briko N. I. The burden of pneumococcal infections and the directions of improving epidemiological surveillance in Russia. Epidemiol. i Infekc. Bolezn. Aktual. Vopr. Epidemiology Infect. Dis Curr Items 2013; 6: 4–9. [in Russian]
- Королева И.С., Харит С.М., Рулева А.А., Перова А.Л., Сидоренко С.В. Пневмококковая инфекция в России — эпидемиологическая ситуация. Вакцинация в современном мире. 2010; 12—18. / Koroleva I. S., Kharit S. M., Ruleva A. A., Perova A. L., Sidorenko S. V. Pneumococcal infection in Russia: epidemiological situation. 2010; 12—18. [in Russian]
- Королева И.С., Королева М.А., Мельникова А.А. Эпидемиология гнойных бактериальных менингитов в период вакцинопрофилактики пневмококковой и гемофильной инфекций в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017; 6: 63–68. / Koroleva, I. S., Koroleva M. A., Melnikova A. A. Epidemiology of purulent bacterial meningitis in the

- period of pneumococcal and haemophilus vaccination in the Russian Federation. *Epidemiologia i Infekc. Bolezn Aktual Vopr. Epidemiol Infect Dis Curr Items* 2017; 6. [in Russian]
5. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Маянский Н.А., Куличенко Т.В., Полунина Т.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Катосова Л.К., Пономаренко О.А., Колтунов И.Е., Иваненко А.М., Дегтярева Е.А., Кондратенко Н.В., Корсунский А.А., Константинов К.В., Тулунов Д.А., Лазарева М.А. Роль *Streptococcus pneumoniae* в структуре бактериальных инфекций у детей, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011–2012 гг. *Педиатрическая фармакология*. 2013; 10 (5): 6–12. / Baranov A. A. et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* in the Structure of Bacterial Infections in the Children Hospitalized to Inpatient Hospitals in Moscow in 2011–2012. *Pediatr Pharmacol* 2013; 10: 6–12. [in Russian]
 6. Козлов Р.С., Кречикова О.И., Муравьев А.А., Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Таточенко В.К., Щербаков М.Е., Родникова В.Ю., Романенко В.В., Сафьянов К.Н. и группа исследователей RAPIRUS. Результаты исследования распространенности в России внебольничной пневмонии и острого среднего отита у детей в возрасте до 5 лет (RAPIRUS). Роль *S.pneumoniae* и *H.influenzae* в этиологии данных заболеваний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15: 246–260. / Kozlov R. S. et al. Incidence of Community-Acquired Pneumonia and Acute Otitis Media in Children 0–5 Years in Russia and Role of *S.pneumoniae* or *H.influenzae* in the Etiology of the Diseases. *Clin Microbiol Antimicrob Chemother* 2013; 15: 246–260. [in Russian]
 7. Tatchenko V. и др. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program. *Expert Rev. Vaccines* 2013; 13: 257–264.
 8. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Иваненко А.М., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Лазарева А.В., Куличенко Т.В., Намазова-Баранова Л.С. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae*. *Вопросы диагностики в педиатрии*, 2013, 5(3): 5–13. / Mayanskiy N. A. et al. Bacterial etiology of acute otitis media in children below 5 years of age: the role of *Streptococcus pneumoniae*. *Vopr Diagnostv Pediatr. Diagn Issues Pediatr Russ* 2013; 5: 5–13. [in Russian]
 9. Mayanskiy N., Alyabieva N., Kozlov R. S. Serotype distribution and antibiotic-resistance of paediatric *Streptococcus pneumoniae* in Moscow. в Abstract (poster session) P217329 April 2013. Abstract (poster session). ECCMID 2013. (2013).
 10. Gostev V., Volkova M., Belanov S. et al. Etiology of acute otitis media and pneumococcal serotypes in children from Saint Petersburg. в ECCMID 2012. Abstract P984. (2013).
 11. Калиногорская О.С., Беланов С.С., Волкова М.О., Гостев В.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность и серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010–2013 гг. *Антибиотики и химиотерапия*. 2015; 60: 1–2. / Kalinogorskaya O. S., Belanov S. S., Volkova M. O., Gostev V. V., Sidorenko S. V. Antibiotic Resistance and Serotype Pattern of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Children in St.Petersburg in 2010–2013. 2015; 60: 1–2: 10–18. [in Russian]
 12. Перова А.Л., Рулева А.А., Беланов С.С., Харит С.М., Сидоренко С.В. Клинические и бактериологические особенности острых средних отитов у детей в возрасте до 5 лет: предварительные данные. *Педиатрическая фармакология*. 2012; 9 (5): 22–27. / Perova A. L., Ruleva A. A., Belanov S. S., Kharit S. M., Sidorenko, S. V. Clinical and bacteriological peculiarities of the acute otitis media in children of 0–5 years of age: provisional data. *Pediatricheskaya farmakologiya* 2012; 5: 22–27. [in Russian]
 13. Муравьев А.А., Козлов Р.С., Лебедева Н.Н. Эпидемиология серотипов *S.pneumoniae* на территории Российской Федерации. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19 (3): 200–206. / Muravyev A. A., Kozlov R. S., Lebedeva N. N. Epidemiology of *S.pneumoniae* serotypes in the Russian Federation. *Clin Microbiol Antimicrob Chemother Russ* 2017; 19: 200–206. [in Russian]
 14. Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Пономаренко О.А., Маянский Н.А., Иваненко А.М., Куличенко Т.В., Намазова-Баранова Л.С. Серотиповый пейзаж и антибиотикочувствительность *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей с острым средним отитом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2013; 15 (2): 12. / Alyabeva N.M., Lazareva A.V., Ponomarenko O.A., Mayanskiy N.A., Ivanenko A.M., Kulichenko T.V., Namazova-Baranova L.S. Serotipovoj pejzazh i antibiotikochuvstvitel'nost' *Streptococcus pneumoniae*, vydelenykh u detej s ostrym srednim otitom. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2013; 15: 2: 12. [in Russian]
 15. Kozlov R., Chagaryan A., Kozlova L., Muraviov A. Penicillin resistance of predominant serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in children of the Russian Federation. в Poster ECCMID 2012.
 16. Сидоренко С.В., Савинова Т.А. Популяционная структура пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину и перспективы антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной резистентности. *Антибиотики и химиотерапия*. 2011; 56: 11–18. / Sidorenko S.V., Savinova T.A. Populyatsionnaya struktura pnevmokokkov so snizhennoj chuvstvitel'nost'yu k penitsillinu i perspektivy antipnevmokokkovoj vaksinatсии dlya sderzhivaniya rasprostraneniya antibakterial'noj rezistentnosti. *Antibiotiki i khimioter* 2011; 56: 5: 11–18. [in Russian]
 17. Козлов Р.С., Сивая О.В., Шпынев К.В., Кречикова О.И. и др. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pneumoniae* в России в 1999–2005 гг: результаты многоцентровых проспективных исследований ПеГАС-I и ПеГАС-II. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2006; 8 (1): 33–47. / Kozlov R. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Russia in 1999–2005: results of Multicentre Prospective Studies PEHASus-I and PEHASus-II. *Clin Microbiol Antibiotiki i Khimioter* 2006; 8: 33–47. [in Russian]
 18. Alyabieva N., Mayanskiy N., Ponomarenko O. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in children with acute bacterial infection in Russia. в Poster ECCMID; 2012.
 19. Koroleva I., Beloshitskiy G. Epidemiological characteristics of pneumococcal meningitis in children aged under 6 years of age in the Russian Federation. *Epidemiol Infect Dis* 2012; 1: 18–21.
 20. Савинова Т.А., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. Перспективы применения антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибиотикорезистентности среди пневмококков. *Антибиотики и химиотерапия* 2011; 56: 3–10. / Savinova T., Sidorenko S. Prognosis of antipneumococcal vaccination application to control the spread of resistance among pneumococci in Russia. *Antibiotiki i Khimioter* 2011; 56: 5: 2–10. [in Russian]
 21. Griffin M. R., Zhu Y., Moore M. R., Whitney C. G., Grijalva C. G. U.S. Hospitalizations for Pneumonia after a Decade of Pneumococcal Vaccination. *New Engl Med* 2013; 369: 683–683.
 22. Hortal M. et al. Hospitalized children with pneumonia in Uruguay: Pre and post introduction of 7 and 13-valent pneumococcal conjugated vaccines into the National Immunization Program. *Vaccine* 2012; 30: 4934–4938.
 23. Farkouh R. A. et al. Cost-effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: Germany, Greece, and The Netherlands. *J Infect* 2011; 64: 54–67.
 24. Fletcher M. A., Fritzell B. Pneumococcal Conjugate Vaccines and Otitis Media: An Appraisal of the Clinical Trials. *Int J Otolaryngol* 2012; 1–15.
 25. Брикo Н. И. и др. Результаты трехлетней вакцинации детей против пневмококковой инфекции в России. *Педиатрическая фармакология*. 2018; 15 (4): 287–299. / Briko N. I. i dr. Rezul'taty trekhletnej vaktsinatsii detej protiv pnevmokokkovoj infektsii v Rossii. *Pediatricheskaya farmakologiya* 2018; 15: 287–299. [in Russian]
 26. Overturf G. D. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 2000; 106: 367–376.
 27. Ubukata K. et al. Serotype changes and drug resistance in invasive pneumococcal diseases in adults after vaccinations in children, Japan, 2010–2013. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 1956–1965.
 28. PubMLST database. Доступно на: <https://pubmlst.org/>.
 29. Treangen T. J., Ondov B. D., Koren S., Phillippy A. M. Rapid Core-Genome Alignment and Visualization for Thousands of Microbial Genomes. *bioRxiv* 2014. doi:doi: <http://dx.doi.org/10.1101/007351>
 30. Edgar R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1792–1797.
 31. Stamatakis A. RAXML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014; 30: 1312–1313.
 32. Letunic I., Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: W242–W245.
 33. Tonkin-Hill G., Lees J. A., Bentley S. D., Frost S. D. W., Corander J. R. R. BAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. *Wellcome Open Res* 2018; 3: 93.
 34. Cheng L., Connor T. R., Sirén J., Aanensen D. M., Corander J. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 1224–1228.
 35. Huson D. H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 2006; 23: 254–267.
 36. Anders Gonçalves da Silva. Pairwise SNP difference summary. https://github.com/MDU-PHL/pairwise_snp_differences/blob/master/pairwise_snp_differences.Rmd.
 37. Enright M. C., Spratt B. G. Extensive Variation in the *ddl* Gene of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Results from a

- Hitchhiking Effect Driven by the Penicillin- Binding Protein 2b Gene. 1998; 1687—1695.
38. Wyres K. L. et al. The multidrug-resistant PMEN1 pneumococcus is a paradigm for genetic success. *Genome Biol* 2012. doi:10.1186/gb-2012-13-11-r103
 39. Richter S. S. et al. Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999—2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1074—1083.
 40. Simoes A. S., Pereira L., Lencastre H. D., Sa R. Clonal Evolution Leading to Maintenance of Antibiotic Resistance Rates among Colonizing Pneumococci in the PCV7 Era in Portugal 2011; 49: 2810—2817.
 41. Philippe H. et al. Resolving Difficult Phylogenetic Questions? Why More Sequences Are Not Enough. *PLoS Biol.* 9, e1000602. 2011.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Цветкова Ирина Анатольевна — младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Беланов Сергей Сергеевич — к. б. н., Университет Хельсинки, Институт Биотехнологии, Лаборатория геномики и секвенирования ДНК, научный сотрудник, Хельсинки, Финляндия

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н., научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Волкова Марина Олеговна — к. м. н., врач-микробиолог, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Мохов Алексей Сергеевич — ведущий специалист-аналитик сектора анализа социальных и демографических процессов отдела анализа общественного мнения и социальных проблем, Санкт-Петербургское государственное

унитарное предприятие «Санкт-Петербургский информационно-аналитический центр» (СПб ГУП «СПб ИАЦ»), Санкт-Петербург

Никитина Екатерина Валерьевна — к. б. н., младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Калисникова Екатерина Леонидовна — врач клинической лабораторной диагностики, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Иванова Ксения Алексеевна — лаборант-исследователь, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Володина Анастасия Александровна — иммунолог II категории, ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Сидоренко Сергей Владимирович — д. м. н., профессор, Отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Эффективность применения фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* при вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей

*Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹, С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ², Е. В. ПЕРСИЯНОВА²,
Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, А. Л. ШУТИКОВА¹, Н. М. ШЕВЧЕНКО³, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹

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

² Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Efficacy of Fucoidan from Brown Algae of the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* in Vaccination Against Seasonal Influenza in the Elderly People

*T. S. ZAPOROZHETS¹, S. P. KRYZHANOVSKY², E. V. PERSIANOVA², T. A. KUZNETSOVA¹,
A. L. SHUTIKOVA¹, N. M. SHEVCHENKO³, N. N. BESEDNOVA¹

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

² Medical association of the Far Eastern branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

³ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok

Изучена эффективность применения фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* при вакцинации против сезонного гриппа у лиц, требующих приоритетной защиты из-за высокого риска заболевания и развития постинфекционных осложнений (пожилые люди). 40 участников в возрасте от 57 до 82 лет принимали фукоидан, начиная со дня вакцинации (вакцина «Совигрипп») в дозе 100 мг 2 раза в день в течение 30 дней. Через 5 нед. после вакцинации иммунный ответ к штаммам А/Н1N1 и А/Н3N2 у пожилых людей контрольной группы не достигал критериев Европейского комитета по патентованным лекарственным препаратам, концентрация антител в сыворотке крови не отличалась от базового уровня. В группе участников, принимавших фукоидан, уровень сероконверсии и серопротекции был выше такового в контрольной группе, средний геометрический титр (СГТ) антител ко всем 3 штаммам значительно превышал таковой до вакцинации. СГТ антител к вирусу гриппа В после вакцинации в опытной группе значительно превышал показатели контрольной группы. У стратифицированных по титрам превакцинальных антител (<1:40) участников опытной группы коэффициент и уровень сероконверсии к штаммам А/Н1N1 и А/Н3N2 были выше таковых в контрольной группе и достигали критериев Европейского комитета для А/Н3N2 (2,5). Уровень серопротекции у стратифицированных участников ко всем трём штаммам также был выше в опытной группе, чем в контрольной. Для вируса А/Н1N1 критерии Европейского комитета не были достигнуты в обеих группах. Фукоидан из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* может применяться для повышения эффективности вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей. Для подтверждения полученных выводов необходимо проведение дальнейших исследований на большом клиническом материале с оценкой функциональной активности клеток иммунной системы и системы цитокинов.

Ключевые слова: вакцинация, грипп, адъюванты, фукоидан, сульфатированные полисахариды, бурые водоросли, пожилые люди.

The efficacy of fucoidan from brown algae of the Okhotsk sea *Fucus evanescens* in vaccination against seasonal influenza in people requiring priority protection due to the high risk of disease and the development of post-infective complications (elderly people) was studied. 40 participants aged 57 to 82 years participated in a number of ways, starting from the day of vaccination (vaccine «Sovigripp») in the dose 100 mg 2 times a day for 30 days. Through 5 weeks after vaccination, the immune response to strains А/Н1N1 and а/Н3N2 in the elderly control group did not meet the criteria of the European Committee on patented drugs, the concentration of antibodies in serum did not differ from the baseline. In the group of participants taking fucoidan, the level of seroconversion and seroprotection was higher than that in the control group, the mean geometric titer (SGT) of antibodies to all 3 strains significantly exceeded that before vaccination. SGT of antibodies to influenza b virus after vaccination in the experimental group significantly exceeded the parameters of the control group. In titer-stratified pre-vaccination antibodies (<1:40) in the experimental group, the seroconversion coefficient and level to strains А/Н1N1 and а/Н3N2 were higher than those in the control group and reached the European Committee criteria for А/Н3N2 (2.5). The level of seroprotection in stratified participants to all three strains was also higher in the experimental group than in the control group. For the а/Н1N1 virus, the European Committee criteria were not met in both groups. Fucoidan from brown algae of the Okhotsk sea *Fucus evanescens* can be used to improve the efficacy of vaccination against seasonal influenza in the elderly. To confirm the findings, it is necessary to conduct further studies on a large clinical material with an assessment of the functional activity of cells of the immune system and the cytokine system.

Keywords: vaccination, influenza, adjuvants, fucoidan, sulfated polysaccharides, brown alga, elderly people.

© Коллектив авторов, 2019

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

Грипп — острая вирусная инфекция, вызывающая сезонные эпидемии. По оценкам ВОЗ, ежегодно регистрируется от 3 до 5 млн случаев тяжёлого течения инфекции и от 250 000 до 500 000 летальных исходов, большинство из которых приходится на пожилых людей в возрасте 65 лет и старше и людей с ослабленным иммунитетом [1]. Серьёзную опасность для них представляют тяжёлые клинические осложнения — пневмония, бронхиты, вторичные бактериальные инфекции верхних дыхательных путей, осложнения со стороны нервной и сердечно-сосудистой систем. Вакцинация — основное средство предотвращения и борьбы с гриппом, особенно важна для людей из групп риска [2, 3]. В то же время известно, что способность синтезировать антитела у пожилых людей снижена [4, 5]. Клиническая эффективность вакцин против гриппа у пожилых людей составляет 17–53% в зависимости от циркулирующих вирусов (при 70–90% эффективности у молодых) [6]. Большинство пожилых пациентов остаются серонегативными, а среди серопозитивных — не наблюдается динамики специфических антител [3]. Однако вакцинация, менее эффективная с точки зрения предотвращения болезни, ослабляет её тяжесть и уменьшает вероятность развития осложнений и смертельного исхода.

Перспективным решением проблемы, связанной с преодолением низкой эффективности вакцинации у пожилых людей, является использование средств, восстанавливающих адекватное реагирование на введение различных вакцинных препаратов, в том числе соединений, действие которых основывается на стимуляции Толл-подобных рецепторов (TLR) [2, 7–9].

К числу таких соединений относятся сульфатированные полисахариды из морских бурых водорослей — фукоиданы. Ранее нами была установлена способность фукоидана из *Fucus evanescens* выступать в качестве лигандов TLR клеток врождённого иммунитета, специфически связываясь с TLR2 и TLR4 и активируя ядерный фактор транскрипции NF- κ B [10]. Показано также, что фукоидан из *Fucus evanescens* повышает иммуногенность инактивированного вируса гриппа А/Калифорния, активируя клетки врождённого и адаптивного иммунитета и стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов, преимущественно синтезируемых T $\times$ 1 [11].

Эти свойства определяют возможность использования фукоидана из *Fucus evanescens* для повышения защитной эффективности гриппозных вакцин.

Цель — установить эффективность применения фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* в составе БАД «Фуколам-экстра» при вакцинации против сезонного гриппа у лиц, требующих приоритетной защиты из-за

высокого риска заболевания и развития постинфекционных осложнений (пожилые люди).

Материал и методы

Исследование проведено в эпидемический сезон гриппа 2018–2019 гг. в соответствии с основными этическими принципами эпидемиологических исследований и Хельсинкской декларации. Протокол испытания и все соответствующие документы были одобрены Этическим комитетом МО ДВО РАН. Письменное информированное согласие было получено от всех потенциальных участников.

Первоначальный скрининг-визит проводился за 4 нед. до регистрации и рандомизации участников исследования. При сборе анамнеза и клиническом осмотре отбор пациентов проводился в соответствии с критериями включения и исключения. Лица, не удовлетворяющие критериям включения в исследование, получили медицинский отвод. На условиях информированного добровольного согласия в исследование включили 40 участников (2 мужчин и 38 женщины) в возрасте от 58 до 82 лет (средний возраст $64,4 \pm 2,4$). Участники, прошедшие первичный отбор для включения в исследование, были случайным образом распределены в соотношении 1:1. Распределение участников по группам проводилось рандомизацией вручную с помощью метода «запечатанных конвертов». Существенных различий по возрасту, полу между двумя группами не было. Через 4 нед. после рандомизации участников исследования иммунизировали вакциной «Совигрипп» однократно внутримышечно в верхнюю треть наружной поверхности плеча (в дельтовидную мышцу) в объёме 0,5 мл (1 доза). Участники первой группы начали принимать БАД «Фуколам-экстра», начиная со дня вакцинации по 1 капсуле 2 раза в день в течение 30 дней.

Биологически активная добавка «Фуколам-экстра» на основе фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* (капсулы по 0,1 г) разрешена к применению (свидетельство Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о государственной регистрации № RU.77.99.88.003.E.000398.02.16 от 01.02.2016), изготовлена Тихоокеанским институтом биоорганической химии ДВО РАН. Показатели безопасности «Фуколам-экстра» не превышают допустимых уровней, регламентируемых СанПин 2.3.2.1078-01 для препаратов из водорослей.

Вакцина «Совигрипп» включает поверхностные антигены (гемагглютинин и нейраминидазу), рекомендованные ВОЗ для эпидемического сезона 2018–2019 гг. А/Michigan/45/2015(H1N1)pdm09, /Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2), B/Colorado/062017 (линия B/Viktoria/2/87), полученные из вируссодержащей аллантоисной жидкости куриных эмбрионов от клинически здоровых кур, и разведённые в фосфатно-солевом буферном растворе, в комплексе с адьювантом СОВИДОН™.

Биологический материал. Для измерения титров специфических антител периферическую кровь у участников собирали натощак из кубитальной вены в начале исследования — до вакцинации (4 нед. до начала приёма в исследование), а затем через 5 нед. после вакцинации. После свёртывания крови пробирки центрифугировали при 500 g в течение 10 мин, сыворотку отбирали, разливали по промаркированным пробиркам и хранили при -20°C до анализа.

Титры антител исследовали с помощью стандартной методики в реакции торможения геагглютинации (РТГА) с использованием Диагностикумов гриппозных для реакции торможения геагглютинации сухих и Сыворотки диагностической гриппозной для реакции торможения геагглютинации сухой производства ООО «ППДП» ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, как описано в МУ 3.3.2.1758-03 [12]. Постановка РТГА включала следующие этапы: подготовку сывороток, определение геагглютинирующего титра в РГА и рабочей дозы вируса, постановку самой реакции. Сыворотки титровали начиная с разведения 1:10.

Таблица 1. Ответ на вакцинацию против гриппа у пожилых людей

Увеличение титра (кратность)	Число участников, %					
	А/Н1N1/		А/Н3N2		В	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
≤1	60	84,6	46,8	53,8	53,4	84,7
2	33,3	15,4	40	46,2	46,6	15,3
4			6,6			
16	6,7		6,6			

Примечание. MRSA — метициллинорезистентный золотистый стафилококк; S — чувствительность; R — резистентность; «—» — чувствительность не изучалась.

Иммунологическую эффективность вакцинации оценивали в соответствии с требованиями Европейского комитета (для лиц старше 60 лет) к противогриппозным вакцинам (СРМР/ВВР/214/96), согласно которым для каждого штамма должен быть достигнут, по крайней мере, один из трёх критериев:

- коэффициент сероконверсии (кратность нарастания среднего геометрического титра антител после вакцинации в сравнении с исходным) — более 2,0.
- уровень сероконверсии (суммарная доля лиц, выраженная в процентах, с повышением титра от серонегативного (<1:40) до серопозитивного или с четырёхкратным приростом титра антител после вакцинации, если до вакцинации титр был 1:40 (более 30%).
- уровень серопротекции (доля лиц, ответивших выработкой антител в титре 1/40 и выше) — более 60%.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 10. Использовали проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений (W-критерия Шапиро–Уилка). Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали *t*-критерий Стьюдента (для независимых выборок и для двух связанных между собой вариационных рядов), двусторонние доверительные интервалы; при ненормальном распределении количественных признаков использовали непараметрический критерий W-Вилкоксона (применяемого для сравнения выборок с попарно связанными вариантами) и непараметрический критерий Манна–Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Выборочные параметры, приводимые далее в таблицах, имеют следующие обозначения: W-критерий Шапиро–Уилк, объём анализируемой выборки (*n*), СГТ — средние геометрические титры антител, ДИ — 95% доверительный интервал, *p* — достигнутый уровень значимости. Все значения *p* являются двусторонними, *p* < 0,05 считалось существенным.

Результаты и обсуждение

Гуморальный иммунный ответ на вакцинацию оценивали путём сравнения титров ингибирования гемагглютинации до и через 5 нед. после иммунизации. Условно защитные титры антител (1:40 и >) к вирусу гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 имели, соответственно, 33 и 65% участников в опытной группе, 20 и 50% — в контрольной группе. Условно защитный титр антител к вирусу гриппа В имели все обследуемые в обеих группах.

Индивидуальные титры антител к вирусу гриппа А/Н1N1 регистрировались в диапазоне от 1:5 до 1:80. С низкими титрами антител (1:5—1:10) в опытной группе было 3/20 (15%) участников, в контрольной группе — 10/20 (50%) участников, со средними значениями титров антител (1:20) — 12/44 (27%) и 8/50 (16%), соответственно. Диапа-

зон индивидуальных титров антител к вирусу гриппа А/Н3N2 определялся от 1:20 до 1:80, к вирусу В — от 1:180 до 1:320. Значимых различий СГТ ко всем трём вирусам до вакцинации в опытной и контрольной группе не выявлено (*p* = 1,000).

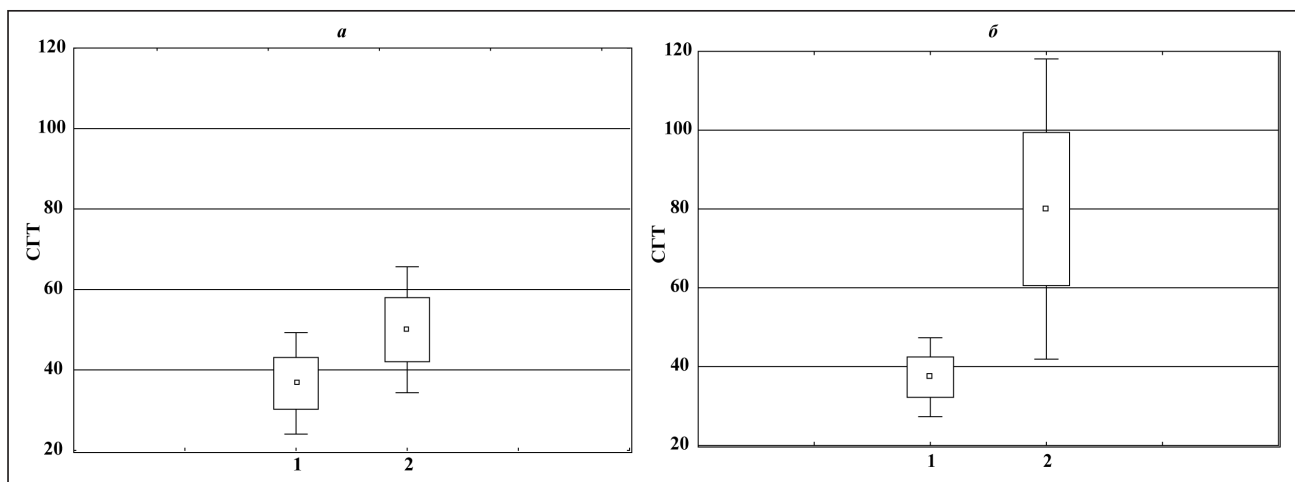
Через 5 нед. после вакцинации большинство вакцинированных лиц не отвечали на вакцинацию или имели минимальный ответ (увеличение титра в два раза). Различия в способности трёх антигенов гемагглютинина индуцировать выработку антител отражены в табл. 1.

Уровень серопротекции (титры антител >1:40) к вирусу гриппа А/Н1N1 в контрольной группе составлял 25%, в опытной группе — увеличился до 40%, максимальные уровни антител достигли 1:160 в контрольной группе, 1:320 — в опытной группе, уровень сероконверсии составил 8,3 и 13,3%, коэффициент сероконверсии — 1,2 и 1,5, соответственно. СГТ антител к вирусу гриппа А в опытной группе значимо превышал таковой до вакцинации (табл. 2).

Защитные титры к вирусу гриппа А/Н3N2 обнаруживались у 92% участников опытной группы и в 55% случаев в контрольной группе, максимальные уровни антител достигли 1:80 в контрольной группе, 1:320 — в опытной группе, уровень сероконверсии составил 15 и 33%, коэффициент сероконверсии — 1,3 и 1,8, соответственно. СГТ антител к вирусу гриппа А/Н3N2 в опытной группе значимо превышал таковой до вакцинации (рисунок).

Коэффициент сероконверсии к вирусу гриппа В составил 1,1 и 1,8, серозащиты — 100 и 100% в контрольной и опытной группе, соответственно. СГТ антител к вирусу гриппа В после вакцинации участников опытной группы значимо превышал таковой у участников контрольной группы (см. табл. 2).

Таким образом, иммунный ответ у пожилых людей после вакцинации не достигал четырёхкратного увеличения ни к одному из антигенных вариантов вируса гриппа. Вместе с тем уровень сероконверсии и серопротекции после вакцинации по отношению к вирусам (Н1N1) и (Н3N2) в группе участников, принимавших фукоидан был выше такового в контрольной группе (см. табл. 2). Концентрация антител ко всем 3 штаммам в сыворотке крови участников контрольной группы значимо не отличалась от базового уровня, тогда



Гемагглютинация, ингибирующая ответ антител к А/Н3N2 у пожилых людей.

а — опытная группа; б — контрольная группа; 1 — до вакцинации; 2 — после вакцинации. Значения представляют собой средние геометрические титры и 95% доверительный интервал ($p=0,003$).

Таблица 2. Иммунологическая эффективность вакцинации с использованием критериев Европейского комитета у всех участников пожилого возраста и у стратифицированных участников по титрам превакцинальных антител (<40) против всех штаммов вакцины

Коэффициент сероконверсии ¹	Все участники		Стратифицированные участники	
	контроль	фукоидан	контроль	фукоидан
A/H1N1	1,2	1,5	0,8	1,5
A/H3N2	1,3	1,8	0,7	2,5*
B	1,1	1,4	1,1	1,8
Уровень сероконверсии, % ²				
A/H1N1	8,3	13,3	0	10
A/H3N2	15	33*	33*	66*
B				
Уровень серопротекции, % ³				
A/H1N1	25	40	0	10
A/H3N2	55	92*	33	66*
B	100*	100*	100*	100*

Примечание. ¹ — среднее геометрическое увеличение, отношение среднего геометрического титра после и до вакцинации; ² — уровень сероконверсии — суммарная доля лиц, выраженная в процентах, с повышением титра от серонегативного (<1:40) до серопозитивного и с четырёхкратным приростом титра антител после вакцинации, если до вакцинации титр был 1:40; ³ — уровень серопротекции — доля лиц, выраженная в процентах, с защитным титром антител через 21–28 дней после вакцинации; * — соответствует критериям Европейского комитета.

Таблица 3. Концентрация специфических антигриппозных антител в сыворотках крови обследуемых пожилых людей

Антиген	Опытная группа				Контрольная группа			
	W ¹	СТГ ³	ДИ ⁴	T ²	W ¹	СТГ ³	ДИ ⁴	T ²
A/H1N1	0,76	22,9	7,2–37,5	0,003	0,77	14,5	8,3–24,9	0,067
	0,59	34,8	38,3–131,6		0,63	17,8	9,7–35,2	
A/H3	0,74	33,2	26,3–48,3	0,007	0,72	31,7	22,5–50,8	0,067
	0,66	60,6	13,8–104,8		0,76	42,3	32,4–67,5	
B	0,63	128,2	105,5–150,4	0,017	0,62	104,7	74,0–65,9	0,179
	0,71	167,5*	138,7–233,9		0,71	114,8	88,2–178,5	

Примечание. ¹ — критерий Shapiro–Wilk; для всех значений W — $p<0,05$ (параметры имеют ненормальное распределение); ² — критерий Wilcoxon; ³ — средний геометрический титр антител (в числителе — до вакцинации, в знаменателе — после вакцинации); ⁴ — 95% доверительный интервал; * — критерий Манна–Уитни; $p<0,05$ (значимость различий показателя между опытной и контрольной группой).

как в опытной группе средний геометрический титр антител значимо превышал таковой до вакцинации (табл. 3).

У стратифицированных по титрам превакцинальных антител (<40) участников опытной группы коэффициент и уровень сероконверсии к

штаммам A/H1N1 и A/H3N2 были выше таковых в контрольной группе и достигали критериев Европейского комитета для A/H3N2 (2,5) (см. табл. 2). Уровень серопротекции ко всем трём штаммам стратифицированных участников также был выше в опытной группе, чем в контрольной. Для

вируса H1N1 критерии Европейского комитета не были достигнуты в обеих группах.

Наиболее выраженное нарастание титров антител отмечено у лиц с низким исходным уровнем (<20), в то время как среди пожилых людей с высоким исходным уровнем антител к вирусам гриппа в парных сыворотках, взятых после иммунизации, титры антител практически оставались на уровне первых образцов, взятых до вакцинации.

ВОЗ настоятельно рекомендует ежегодное применение вакцины против сезонного гриппа, особенно для лиц, требующих приоритетной защиты из-за высокого риска заболевания и развития постинфекционных осложнений, в том числе пожилых людей. Однако даже в те годы, когда существует хорошее соответствие между вакциной и циркулирующими штаммами, связанные с хозяином, факторы, такие как возраст, существовавший ранее иммунитет, генетические полиморфизмы и наличие хронических заболеваний могут поставить под угрозу реагирование на вакцину против гриппа. В последние годы проведено несколько исследований с большим количеством людей для оценки эффективности и действенности вакцины у пожилых. Результаты показывают, что сниженные ответы на вакцины у пожилых людей связаны с уменьшением выработки специфических для вакцины антител [13, 14] и в половине случаев не эффективны [15, 16].

Установлено также, что возрастная дисфункция врождённой и адаптивной иммунной системы пожилых людей, связанная в частности, с нарушенной активацией TLR опосредующих специфическое распознавание эволюционно консервативных молекулярных структур патогенов (PAMP — pathogen associated molecular patterns) влияет как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет и, следовательно, на выработку антител, вызванную гриппозной вакциной [17].

В этой связи использование средств, действие которых основано на стимуляции TLR, обоснованно и перспективно для восстановления адекватного реагирования на введение вакцинных препаратов. К их числу относятся — сульфатированные полисахариды бурых водорослей (фукоиданы), являющиеся природными лигандами рецепторов клеток врождённого иммунитета. В результате взаимодействия фукоиданов с TLR активируется транскрипционный ядерный фактор NF- κ B, повышается экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости MHC I и II классов, костимулирующих молекул (CD40, CD80 и CD86) на антиген-представляющих клетках, усиливается продукция провоспалительных цитокинов, активируются Т- и В-лимфоциты, участвующие в формировании эффективной иммунной памяти к вакцинному антигену [18, 19].

Экспериментальные исследования свидетельствуют об адъювантных свойствах фукоиданов в отношении различных антигенов и вакцинных штаммов возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе гриппа. Показано усиление продукции специфических к овальбумину иммуноглобулинов IgG1 and IgG2a, а также Т-клеточного ответа и генерации Т-клеток памяти при введении мышам фукоиданов из бурых водорослей *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida* и *Fucus vesiculosus* [20]. Свойства потенциальных адъювантов для усиления иммунного ответа против вируса гриппа проявляли сульфатированные полисахариды из водорослей *Grateloupia filicina*, *Ulva pertusa* и *Sargassum qingdaoense* [21]. Полисахарид из *Sargassum pallidum* усиливал специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ на вакцинные антигены комбинированной вакцины против болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита и птичьего гриппа в экспериментах на цыплятах [22].

Результаты выполненных нами ранее исследований [11] также свидетельствуют об адъювантной активности фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens*, который проявлялся в повышении иммуногенности инактивированного вируса гриппа А. Эффект фукоидана был выражен в большей степени по сравнению с традиционным лицензированным адъювантом гидроксидом алюминия. При повторной иммунизации фукоидан оказывал 7–10-кратный адъювантный эффект, стимулируя формирование антител к вирусу гриппа А, в ответ на введение более низкой дозы вируса СГТ не различались по сравнению с высокими дозами. Это обстоятельство важно с точки зрения снижения антигенной нагрузки, что обеспечивает безопасность вакцинации.

Способность фукоиданов повышать эффективность вакцин имеет большое значение в возрастной иммунологии. В этом плане представляют интерес результаты рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования с участием добровольцев пожилого возраста, которые в течение 4 нед. принимали *per os* фукоидан из *U. pinnatifida* в дозе 300 мг/сут. Последующая иммунизация трёхвалентной вакциной против гриппа приводила к выявлению более высоких титров антител против всех штаммов вируса гриппа, содержащихся в вакцине, по сравнению с титрами у лиц, получавших плацебо [23].

Настоящее исследование впервые демонстрирует эффективность применения фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* в составе БАД «Фуколам-экстра» при вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей. Показано, что иммунный ответ к штаммам А/Н1N1 и А/Н3N2 у пожилых людей контрольной группы после вакцинации не достигал критериев Евро-

пейского комитета, концентрация антител в сыворотке крови не отличалась от базового уровня. В группе участников, принимавших фукоидан из *Fucus evanescens*, уровень сероконверсии и серопротекции был выше такового в контрольной группе, СГТ антител ко всем 3 штаммам значимо превышал таковой до вакцинации.

Полученные нами данные по усилению ответа на вакцинацию против гриппа при приёме фукоидана из *Fucus evanescens* соответствуют мнению исследователей, полагающих, что применение иммуномодуляторов в сочетании с противогриппозной вакциной может приводить к усилению иммунного ответа, формированию быстрой эндогенной защиты, устранению иммунодепрессивного действия гемагглютинаина, стимуляции клеточного звена иммунитета [2, 23].

Важным моментом с точки зрения использования фукоидана из *Fucus evanescens* для усиления ответа на вакцины против гриппа является возможность осуществления эффекта при пероральном применении. Подтверждением возможности трансформации фукоидана в организме человека являются результаты последних исследований по детекции фукоидана в периферической крови после перорального применения полисахарида. Возможность появления производных фукоидана в периферической крови после перорального применения полисахарида подтверждена исследованиями М. R. Irhimeh и соавт. [24], обнаруживших с помощью моноклональных антител к высокосульфатированному фукоидану его производные — галактофукана сульфат — в плазме здоровых участ-

ников, принимавших перорально в течение 12 дней по 3 г/сут порошок водоросли *Undaria*, содержащий 10% производных фукоидана, и очищенный галактофукана сульфат. Средняя концентрация обнаруженного фукоидана в плазме составила, соответственно, 4,002 мг/л и 12,989 мг/л. Y. Tokita и соавт. [25] также обнаружили фукоидан из *Cladosiphon okamuranus* в сыворотке крови и моче здоровых участников через 6 и 9 ч после приёма полисахарида внутрь. Эти факты указывают на возможность деградации молекул фукоидана в организме человека и участие производных структур в реализации адьювантных свойств.

Наше исследование показало возможную дополнительную роль фукоидана из *Fucus evanescens* в выработке антител у пожилых людей при вакцинации против гриппа, хотя необходимы дальнейшие исследования основных адьювантных и иммуномодулирующих механизмов полисахарида.

Заключение

Фукоидан из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* в составе БАД «Фуколам-экстра» может применяться для повышения эффективности вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей. Для подтверждения полученных выводов необходимо проведение дальнейших исследований на большом клиническом материале с оценкой функциональной активности клеток иммунной системы и системы цитокинов.

Исследование выполнено при поддержке Президиума ДВО РАН (проект №18-5-084).

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization Influenza. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en> (дата обращения 23.05.2019).
- Киселев О.И., Маринич И.Г., Соминина А.А. Грипп и другие респираторные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия. СПб-6.: 2003. / Kiselev O.I., Marinich I.G., Somnina A.A. Gripp i drugie respiratornye infekcii: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika i terapiya. SP-b.: 2003. [in Russian]
- Бурцева Е.И. Аспекты вакцинации от гриппа пожилых людей в России. Клиническая геронтология. — 2009. — № 15. — С. 28—32. / Burceva E.I. Aspekty vaktsinacii ot grippa pozhilykh ljyudej v Rossii. Klinicheskaya gerontologiya 2009; 15: 28—32. [in Russian]
- Gavazzi G., Krause K.H. Ageing and infection. Lancet Infect Dis 2002; 2: 659—666.
- Dominguez A., Godoy P., Torner N. The effectiveness of influenza vaccination in different groups. Expert Rev Vaccines 2016; 15: 751—764.
- Goodwin K., Viboud C., Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. Vaccine 2006; 24: 1159—1169.
- Начарова Е.П., Харит С.М., Петленко С.В. Превентивная иммунокоррекция как способ повышения эффективности и безопасности вакцинации. Terra Medica. — 2004. — № 33. — С. 3—7. / Nacharova E.P., Kharit S.M., Petlenko S.V. Preventivnaya immunokorrekcija kak sposob povysheniya effektivnosti i bezopasnosti vaktsinacii. Terra Medica 2004; 33: 3—7. [in Russian]
- Munir M., Mosaheb., Michael L. R., Lee M. W. Toll-like receptor ligand-based vaccine adjuvants require intact MyD88 signaling in antigen-presenting cells for germinal center formation and antibody production. Front Immunol 2017; 8: 225.
- Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Персиянова Е.В., Хотимченко Ю.С., Беседнова Н.Н. Перспективы использования сульфатированных полисахаридов бурых водорослей как вакцинных адьювантов. Биология моря. — 2016. — № 42. — С. 399—406. / Kuznecova T.A., Zaporozhec T.S., Persyanova E.V., Khotimchenko Ju.S., Besednova N.N. Perspektivy ispol'zovaniya sul'fatirovannykh polisakharidov burykh vodoroslej kak vakcinnykh adyuvantov. Biologiya morya 2016; 42: 399—406. [in Russian]
- Макаренкова И.Д., Тухватулин А.И., Ермакова С.П., Логунов Д.Ю., Джаруллаева А.Ш., Ерохова А.С. и др. Влияние фукоидана и трансформированных дериватов из бурой водоросли *Fucus evanescens* на активацию транскрипционного ядерного фактора NF-κB. Здоровье. Медицинская экология. Наука. — 2018. — № 3. — С. 26—32. / Makarenkova I.D., Tukhvatulin A.I., Ermakova S.P., Logunov D.Ju., Dzharrullaeva A.Sh., Erokhova A.S. i dr. Vliyanie fukoidana i transformirovannykh derivatov iz buroj vodorosli *Fucus evanescens* na aktivaciyu transkripcionnogo yadernogo faktora NF-κB. Zdorov'e. Medicinskaya ekologiya. Nauka 2018; 3: 26—32. [in Russian]
- Кузнецова Т.А., Иванушко Л.А., Персиянова Е.В., Шутикова А.Л., Ермакова С.П., Хотимченко М.Ю., Беседнова Н.Н. Оценка адьювантных эффектов фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и его структурных аналогов для усиления аналогов для эффективности вакцин. Биомед хим. — 2017. — № 63. — С. 553—558. / Kuznecova T.A., Ivanushko L.A., Persyanova E.V., Shutikova A.L., Ermakova S.P., Khotimchenko M.Ju., Besednova N.N. Ocenka adyuvantnykh effektivnoy fukoidana iz buroj vodorosli *Fucus evanescens* i ego strukturnykh analogov dlya usileniya analogov dlya effektivnosti vakcin. Biomed khim 2017; 63: 553—558. [in Russian]
- Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. Методические указания. МУ 3.3.2.1758-03, 2003. / Metody opredeleniya pokazatelej kachestva immunobiologicheskikh preparatov dlya profilaktiki i diagnostiki grippa. Metodicheskie ukazaniya. MU 3.3.2.1758-03, 2003. [in Russian]
- Goodwin K., Viboud C., Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. Vaccine 2006; 24: 1159—1169.

14. Sasaki .S, Sullivan M., Narvaez C.F., Holmes T.H., Furman D., Zheng N.Y. *et al.* Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J Clin Invest* 2011; 121: 3109—3119.
15. Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Review. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 36—44.
16. Reber A.J., Chirkova T., Kim J.H., Cao W., Biber R., Shay D.K., Sambhara S. Immunosenescence and challenges of vaccination against influenza in the aging population. *Aging Dis* 2012; 3: 68—90.
17. Panda A., Qian F., Mohanty S., van Duin D., Newman F.K., Zhang L. *et al.* Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *Immunol* 2010; 184: 2518—2527.
18. Synytsya A., Bleha R., Synytsya A., Pohl R., Hayashi K., Yoshinaga K. *et al.* Mekabu fucoidan: structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses. *Carbohydr Polym* 2014; 111: 633—644.
19. Kim S.-Y., Joo H.-G. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci* 2015; 16: 145—150.
20. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar Drugs* 2015; 13: 1084—1104.
21. Song L., Chen X., Liu X., Zhang F., Hu L., Yue Y., Li K., Li P. Characterization and comparison of the structural features, immune-modulatory and anti-avian influenza virus activities conferred by three algal sulfated polysaccharides. *Mar Drugs* 2016; 14: 17—21.
22. Li L.J., Li M.Y., Li Y.T., Feng J.J., Hao F.Q., Lun Z. Adjuvant activity of *Sargassum Pallidum* polysaccharides against combined newcastle disease, infectious bronchitis and avian influenza inactivated vaccines. *Mar Drugs* 2012; 2648—2660.
23. Negishi H., Mori M., Mori H., Yamori Y. Supplementation of elderly japanese men and women with fucoidan from seaweed increases immune responses to seasonal influenza vaccination. *J Nutr* 2013; 143: 1794—1798.
24. Irhimeh M. R., Fitton J. H., Lowenthal R. M., Kongtawelert P. A quantitative method to detect fucoidan in human plasma using a novel antibody. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol* 2005; 27: 705—711.
25. Tokita Y., Nakajima K., Mochida H., Iha M., Nagamine T. Development of a fucoidan-specific antibody and measurement of fucoidan in serum and urine by sandwich ELISA. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2010; 74: 350—357.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Запорожец Татьяна Станиславовна — д. м. н., зам. директора по научной работе, г. н. с. лаборатории иммунологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Крыжановский Сергей Петрович — д. м. н., главный врач МО ДВО РАН, Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

Персиянова Елена Викторовна — к. б. н., зав. лабораторией инновационных медико-биологических исследований и технологий МО ДВО РАН, Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., в. н. с. лаборатории иммунологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Шутикова Анна Леонидовна — к. м. н., м. н. с. лаборатории иммунологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Шевченко Наталья Михайловна — к. х. н., с. н. с. лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Беседнова Наталья Николаевна — д. м. н., профессор, академик РАН, г. н. с. лаборатории иммунологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Характеристика возбудителей у пациентов с карбункулами и особенности антибактериальной химиотерапии

К. В. ЛИПАТОВ¹, *Е. А. КОМАРОВА¹, В. И. ХРУПКИН¹, Ю. Е. ЧЕРКАСОВ¹, М. А. МИРСКАЯ², Е. И. ДЕХИССИ¹

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

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

Characteristic of Pathogens in Patients with Carbuncles and Features of Antibacterial Chemotherapy

K. V. LIPATOV¹, E. A. KOMAROVA¹, V. I. KHRUPKIN¹, YU. E. CHERKASOV¹, M. A. MIRSKAYA², E. I. DEKHISSI¹

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

² City clinical Hospital n.a. I. V. Davydovsky, Moscow

На основании обследования и лечения 446 пациентов с карбункулами выявлено, что основным возбудителем инфекции является золотистый стафилококк преимущественно в виде монокультуры. Среди выделенных штаммов полиантибиотикорезистентные формы (MRSA) составили 13,8%. Наиболее тяжёлое течение карбункулов отмечено у пациентов, страдающих сахарным диабетом, при этом достоверной разницы в частоте выделения метициллинчувствительных и метициллинорезистентных стафилококков не обнаружено. Все выделенные штаммы MRSA характеризовались высокой чувствительностью к ванкомицину и линезолиду. Значительно реже (9,8%) высевался стрептококк группы А, антибиотикорезистентности среди которого выявлено не было. Микробный пейзаж постнекрэктомических ран менялся в течение 3–4 сут. Стрептококк к этому времени исчезал из ран, однако появлялась грамотрицательная микрофлора. Среди этих штаммов более половины характеризовалось полиантибиотикорезистентностью. У страдающих сахарным диабетом пациентов контаминация постнекрэктомических ран госпитальной микрофлорой встречалась значительно чаще, возрастала и частота выделения микробных ассоциаций (47,6%). В подобных ситуациях наблюдалась отрицательная динамика течения раневого процесса. Это определяло необходимость проведения этапных некрэктомий и изменения схем антибактериальной терапии с учётом чувствительности выделенной микрофлоры.

Ключевые слова: карбункул, сахарный диабет, золотистый стафилококк, антибиотикорезистентность.

On the basis of the examination and treatment of 446 patients with carbuncles, it was found that the main infection germ is *Staphylococcus aureus* mainly in the form of monoculture. Among the singled out strains multidrug-resistant forms (MRSA) reached 13,8%. The most severe course of carbuncles was observed in patients with diabetes mellitus, but the true difference in frequency of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus* release wasn't observed. All singled out strains MRSA have a high sensitivity to the vancomycin and linezolid. Much less frequently (9,8%) *Streptococcus* of group A was sown antibiotic resistance wasn't found. Microbial landscape of postcritically wounds was changing in the course of 3–4 days. *Streptococcus* releases such gram-negative microflora among this strains more than the half was characterized by multiantibiotic resistance. Contamination of the postcritically wounds in patients that suffers from diabetes mellitus, with hospital microflora was much frequent than in patients without diabetes mellitus, frequency of the excretion of microbial associations are higher in those with diabetes (47,6%). In such situations the negative dynamic of the wound process. It shows the necessity of conduction of staged necrectomies and changes in antibacterial therapy regimens adjusted to the sensitivity of the singled out microflora.

Keywords: carbuncles, diabetes mellitus, *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance.

Введение

Актуальность проблемы хирургической инфекции сохраняет свою высокую значимость, несмотря на значительные успехи антибактериальной химиотерапии, совершенствование методов диагностики и хирургической техники. Пациенты с инфекциями кожи и подкожной жировой клетчатки составляют более половины среди всех

госпитализированных в отделения гнойной хирургии, а затраты на их лечение не имеют тенденции к снижению [1, 2]. Одним из наиболее распространённых и тяжело протекающих хирургических инфекционных заболеваний мягких тканей является карбункул, представляющий собой острое гнойно-некротическое воспаление нескольких волосяных фолликулов и окружающей подкожной жировой клетчатки [3–5]. Обширные карбункулы протекают с выраженным интоксикационным синдромом, а иногда и осложняются генерализованной инфекцией — сепсисом, со-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: e-mail: kollaps77@rambler.ru

здавая угрозу для жизни пациентов. По данным В.Ф. Войно-Ясенецкого, в доантибактериальную эру карбункулы лица зачастую приводили к летальному исходу, что можно было объяснить отсутствием антибиотиков, малой доступностью медицинской помощи, низким уровнем медицинской грамотности населения в то время [6]. Появление в арсенале хирургов антибактериальных препаратов привело к существенному улучшению результатов лечения карбункулов. К сожалению, в ряде случаев особенно при запоздалом обращении за медицинской помощью, у пациентов, страдающих сахарным диабетом, карбункулы характеризуются крайне неблагоприятным течением с прогрессирующим некрозом тканей и распространением патологического процесса. Наиболее частым возбудителем карбункула является золотистый стафилококк, однако в последние годы всё чаще стали выделяться его полиантибиотикорезистентные штаммы (MRSA — Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), создавая серьёзные трудности при лечении заболевших [7–9]. Кроме того, стали появляться сообщения о развитии суперинфекции в области постнекрэтомических ран, образующихся в процессе хирургического лечения карбункулов [10, 11]. Зачастую она связана с госпитальными штаммами микроорганизмов, отличающимися полиантибиотикорезистентностью [12–14]. Однако публикаций, основанных на анализе значительного клинического материала, совсем немного, поэтому эта тема нуждается в дальнейшем развитии и изучении.

Материал и методы

За 17-летний период (2002–2018 гг.) был проанализирован опыт обследования и лечения 446 пациентов с карбункулами различного размера и локализации. Чаще всего карбункулы возникали в области спины — 94 пациента (21%), задней поверхности шеи — 87 (20%), бедра — 82 (18%), ягодиц — 71 (16%). Значительно реже мы наблюдали другие локализации: передняя брюшная и грудная стенки — 49 (11%), голень 37 (8%), верхняя конечность — 26 (6%). Половых различий мы практически не отметили: мужчин было немногим более половины — 234 (52,5%) Преобладали лица трудоспособного возраста — 255 (57,2%). Все больные были госпитализированы в стационар в экстренном порядке с картиной острого гнойно-некротического процесса. Площадь поражения тканей составляла от 20 см² до 150 см². Наиболее обширные карбункулы отмечались у пациентов, страдающих сахарным диабетом, число которых составляло 82 (18,4%) больных. Именно у этой категории больных патологический процесс характеризовался агрессивным течением, склонностью к прогрессированию, интоксикацией, нередко — сепсисом в силу снижения неспецифической иммунологической резистентности организма, микроангиопатии, обменных нарушений, а также особенностей микробного пейзажа, что создавало существенные трудности при лечении. Все заболевшие были оперированы в экстренном порядке. Наиболее частым оперативным вмешательством стало рассечение карбункула и некрэктомия. При небольших карбункулах, отсутствии выраженного перифокального воспаления, достаточных резервах окружающей кожи использовалась тактика иссечения карбункула в пределах здоровых тка-

ней с наложением первичного шва с дренированием. При обширных карбункулах и невозможности одномоментного удаления всех некротизированных тканей или формирования вторичных некрозов в послеоперационном периоде использовалась тактика этапных некрэктомий, число которых в тяжёлых случаях доходило до 2–3. У всех пациентов во время выполнения первого хирургического вмешательства и далее в динамике (при наличии раны) с периодичностью в 3–4 дня выполнялись микробиологические исследования отделяемого из патологического очага. Определялся видовой состав микрофлоры и его чувствительность к антибактериальным препаратам. Забор материала первоначально осуществлялся интраоперационно, в последующем — во время перевязки. Исследование предполагало определение качественного и количественного состава микрофлоры и определения её антибиотикочувствительности. С этой целью применялся диско-диффузионный метод. Для определения возбудителя раневой экссудат со стенок операционной/послеоперационной раны собирали стерильными дакроновыми тампонами. Затем тампон с отделяемым с целью его разведения до 10⁻² взбалтывали в 5 мл сахарного бульона. Далее полученную смесь высевали в количестве 0,1 мл на чашки Петри с 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 СО₂ в течение 24–48 ч. По прошествии этого времени в каждой чашке проводился подсчёт числа выросших колоний и идентификация каждого возбудителя. Количественное определение микробных тел в 1 г ткани проводили по методу С. Baxter (1973) и E. Loeble (1974) в модификации И. И. Колкера (1981). С этой целью во время хирургического вмешательства из удалённой во время некрэктомии ткани 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 чашку Петри. Их инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре +37°C, в последующем выполняли подсчёт выросших колоний, а количество бактерий в 1 г рассчитывали по формуле: $H = A \times 5 \times X$, где H — количество бактерий в 1 г ткани, A — число выросших колоний, 5 — число перерасчёта, X — число разведений. В послеоперационном периоде всем пациентам проводилась антибактериальная терапия, характер которой базировался на результатах микробиологического исследования. С целью объективизации течения раневого процесса выполняли оценку микроциркуляции в околораневой зоне методом лазерной доплеровской флоуметрии (аппарат ЛАКК-01). После ликвидации воспалительных явлений и очищения ран решался вопрос о целесообразности хирургического закрытия раневого дефекта путём наложения вторичных швов или с помощью аутодермопластики свободным расщепленным трансплантатом.

Результаты и обсуждение

Проведённые первичные микробиологические исследования позволили в большинстве случаев идентифицировать возбудителя — 428 (96%) случаев. Как показал анализ этих результатов, чаще всего из гнойно-некротических очагов высеивался *Staphylococcus aureus* — 376 (87,9%) наблюдений, преимущественно в виде монокультуры (96,8%), значительно реже в виде ассоциаций с другими микроорганизмами (3,2%). У 42 (9,8%) заболевших выделен *Streptococcus pyogenes*. Случаи высеивания других микроорганизмов при проведении первичного посева были единичными, что соответствует существующим данным. Анализируя видовые особенности высеянных штам-

Таблица 1. Характеристика антибиотикочувствительности выделенной грамположительной кокковой флоры (в %)

Антибиотик	Возбудитель					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	S	R	S	R	S	R
Гентамицин	100	0	—	—	—	—
Линкомицин	100	0	0	100	100	0
Клиндамицин	100	0	0	100	100	0
Эритромицин	96,3	3,7	20,4	79,6	100	0
Ванкомицин	100	0	100	0	—	—
Рифампицин	100	0	90,2	9,8	—	—
Ципрофлоксацин	99,1	0,9	—	—	—	—
Линезолид	100	0	100	0	—	—

Примечание. MRSA — метициллинорезистентный золотистый стафилококк; S — чувствительность; R — резистентность; «—» — чувствительность не изучалась.

Таблица 2. Частота выделения различных представителей грамотрицательной флоры из постнекрэктомических ран

Возбудитель	Частота выделения, %
<i>Escherichia coli</i>	11,7
<i>E.coli</i> БЛРС	5,5
<i>Proteus mirabilis</i>	8,5
<i>P.mirabilis</i> БЛРС	28,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17,5
<i>K.pneumoniae</i> БЛРС	9,1
<i>Acinetobacter</i>	13,3

мов золотистого стафилококка и его чувствительность к антибиотикам, было обнаружено, что нередко инфекционный процесс был связан с полиантибиотикорезистентными формами микроорганизма (MRSA) — 52 (13,8%) наблюдения. При этом все выделенные штаммы MRSA характеризовались высокой чувствительностью к ванкомицину и линезолиду. Среди стрептококков резистентных к антибиотикам форм обнаружено не было (табл. 1). Сравнивая частоту выделения резистентных форм золотистого стафилококка у пациентов, страдающих сахарным диабетом и без него, отметим, что достоверной разницы обнаружено не было.

При анализе динамики микробного пейзажа постнекрэктомических ран был обнаружен ряд особенностей. Клиническая картина течения

раневого процесса коррелировала с количеством и качеством раневой микрофлоры. Ранее отмечалось, что наиболее тяжёлое течение карбункулов наблюдалось у пациентов, страдающих сахарным диабетом. Отмечался обширный и зачастую прогрессирующий некроз подкожной жировой клетчатки и кожи. По данным ЛДФ, околораневая зона характеризовалась выраженными расстройствами микроциркуляции. Повторные посевы из очагов инфекции позволили констатировать факт существенных изменений микробного пейзажа. В первую очередь это касалось случаев, когда после первичной операции сохранялся выраженный воспалительный процесс, а зона некротического поражения тканей расширялась, определяя необходимость выполнения повторных хирургических вмешательств. Если первичным возбудителем инфекции являлся *Streptococcus pyogenes*, то к 3–4-м суткам после операции он полностью исчезал из ран, замещаясь грамотрицательной микрофлорой, среди которой наиболее часто высевались такие микроорганизмы, как *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp. (табл. 2). Среди них более половины штаммов характеризовались полиантибиотикорезистентностью (табл. 3, 4). *Staphylococcus aureus*, как правило, на протяжении 5–7 сут. сохранялся в ранах. При этом частота MRSA увеличивалась до 23,4%. Но

Таблица 3. Характеристика антибиотикочувствительности выделенных энтеробактерий

Возбудитель	<i>Escherichia coli</i> , %		<i>E.coli</i> БЛРС, %		<i>Proteus mirabilis</i> , %		<i>P.mirabilis</i> БЛРС, %		<i>Klebsiella pneumoniae</i> , %		<i>K.pneumoniae</i> БЛРС, %	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Антибиотик	100	0	71	29	71	29	10	90	90	10	41	59
Амикацин	100	0	92	8	100	0	70	30	100	0	84	16
Ципрофлоксацин	82	18	33	67	71	29	14	86	98	2	23	77
Цефтазидим	100	0	0	100	100	0	100	0	100	0	0	100
Цефепим	100	0	11	89	100	0	15	85	100	0	13	87
Цефтриаксон	100	0	0	100	100	0	100	0	100	0	100	0
Цефоперазон	100	0	0	100	100	0	100	0	100	0	100	0
Сульбактам	100	0	92	0	100	0	97	3	100	0	68	32
Меропенем	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
Тиенам	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

Примечание. БЛРС — бета-лактамазы расширенного спектра; S — чувствительность; R — резистентность.

Таблица 4. Характеристика антибиотикочувствительности выделенных неферментирующих бактерий

Антибиотик	Возбудитель			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter</i>	
	S, %	R, %	S, %	R, %
Гентамицин	68	32	3	97
Амикацин	89	11	17	83
Ципрофлоксацин	64	36	6	94
Цефтазидим	75	25	5	95
Цефепим	77	23	9	91
Цефоперазон	76	24	3	97
Сульбактам	94	6	93	7
Меронем	75	25	40	60
Тиенам	74	26	40	60

Примечание. S — чувствительность; R — резистентность.

и в этих случаях штаммов, резистентных к ванкомицину и линезолиду, обнаружено не было. У пациентов, страдающих сахарным диабетом, на фоне осложнённого течения раневого процесса резко возросло число микробных ассоциаций, включающих наряду с золотистым стафилококком вышеупомянутые грамотрицательные микроорганизмы (см. табл. 3). Так, среди пациентов с сопутствующим сахарным диабетом к 4–5-м суткам после первичной операции частота выделения микробных ассоциаций из ран составляла 47,6%, у остальных заболевших — 19,4%. Изменения в характере бактериальной микрофлоры определяли и перемены в антибактериальной химиотерапии. При этом хирургическая санация очагов инфекции, включающая первичную хирургическую обработку гнойно-некротического очага, дополняемую при необходимости этапными некрэктомиями, расценивалась как основополагающий фактор в борьбе с инфекцией. Проведённое комплексное лечение позволило во всех случаях добиться положительной динамики в виде стихания воспалительного процесса

ЛИТЕРАТУРА

1. Винник Ю.С., Маркелова Н.Н., Тюрюмин В.С. Современные методы лечения гнойных ран. Сибирское медицинское обозрение. — 2013. — № 1. — С. 18–21. / Vinnik YU.S., Markelova N.N., Tyuryumin V.S. Sovremennye metody lecheniya gnoynykh ran. Sibirskoe meditsinskoe obozrenie 2013; 1: 18–21. [in Russian]
2. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации. М.: 2015. — 109 с. / Khirurgicheskie infektsii kozhi i myagkikh tkaney. Rossiyskie natsionalnye rekomendatsii. M.: 2015; 109. [in Russian]
3. Гостищев В.К. Инфекции в хирургии: Руководство для врачей. М.: Гэотар-Медиа; 2007. / Gostishchev V.K. Infektsii v khirurgii: Rukovodstvo dlya vrachev. M.: Geotar-Media; 2007. [in Russian]
4. Деватов В.А., Приб А.И., Козлов А.Б. Пути улучшения амбулаторной помощи больным с хирургической инфекцией. Хирургия. — 1993. — № 4. — С. 79–84. / Devyatov V.A., Prib A.I., Kozlov A.B. Puti uluchsheniya ambulatornoy pomoshchi bolnym s khirurgicheskoy infektsiei. Khirurgiya 1993; 4: 79–84. [in Russian]
5. Mufassar Nishat, Ansar Latif, Namra Chaudhry. Manadgement of Carbuncle; Prognosis of Surgical treatment. PJMHS Apr-Jun 2018; 12: 2: 638–639.
6. Войно-Ясенецкий В.Ф. Очерки гнойной хирургии. СПб.: БИНОМ; 2000. / Voyno-Yasensetskiy V.F. Ocherki gnoynoy khirurgii. SPb.: BINOM; 2000. [in Russian]

и очищения постнекрэктомической раны. Летальных исходов не было. Однако существенная разница в течении раневого процесса у больных сахарным диабетом и без него, определяемая в том числе и контаминацией ран госпитальной грамотрицательной микрофлорой, стала одной из основных причин удлинения сроков стационарного лечения пациентов с сахарным диабетом. Их средняя длительность пребывания в стационаре увеличилась в 1,6 раза, определяя и значительное увеличение затрат на лечение.

Заключение

Для карбункула как для типичного представителя инфекций кожи и подкожной жировой клетчатки основным возбудителем является золотистый стафилококк, среди штаммов которого особое значение имеют полиантибиотикорезистентные штаммы (MRSA). В рамках настоящего исследования не были обнаружены ванкомицинорезистентные стафилококки. Карбункулы у пациентов, страдающих сахарным диабетом, отличаются более тяжёлым течением. Для них в значительной степени характерна контаминация постнекрэктомических ран госпитальной грамотрицательной микрофлорой, вносящей свою лепту в осложнённое прогрессирующим некрозом тканей течение раневого процесса. Изменения характера бактериальной микрофлоры в очаге инфекции на 3–4-е сутки после первичного оперативного вмешательства определяют важность микробиологического мониторинга ран и коррекции схем антибактериальной терапии в соответствии с чувствительностью микрофлоры к антибиотикам. Эффективность лечения пациентов с карбункулами базируется на адекватной хирургической санации очага и рациональной антибактериальной химиотерапии.

7. Дворникова Е.В., Соркина Е.М., Каратаева И.В., Корсунская И.М. Бактериальные инфекции кожи. Cons. med. — 2012. — № 2. — С. 4–7. / Dvornikova E.V., Sorkina E.M., Karataeva I.V., Korsunskaya I.M. Bakterialnye infektsii kozhi. Cons. med 2012; 2: 4–7. [in Russian]
8. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of skin and soft Tissue infections 2014. Update by the Infections diseased society of America. Clin Infect Dis 2014.
9. Clebak K.T., Malone M.A. Skin infections. Prime Care 2018; 45: 3: 433–454.
10. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л. Особенности микробных ассоциаций при гнойно-септических инфекциях в отделении раневой инфекции хирургии многопрофильного стационара. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. — 2013. — № 3. — С. 154–163. / Mitrofanova N.N., Melnikov V.L. Osobennosti mikrobykh assotsiatsiy pri gnoyno-septicheskikh infektsiyakh v otdelenii raneyoy infektsii khirurgii mnogoprofilnogo statsionara. Izvestiya vysshihkh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region 2013; 3: 154–163. [in Russian]
11. Бесчастнов В.В., Певнев А.А., Малахова И.И., Московская А.Е. Результаты микробиологического мониторинга лечения гнойных ран в условиях общехирургического стационара. Современные технологии в медицине. — 2009. — № 2. — С. 53–56. / Beschastnov V.V., Pevnev A.A., Malakhova I.I., Moskovskaya A.E. Rezultaty mikrobiologicheskogo monitoringa lecheniya gnoynykh ran v usloviyakh obshchekhirurgicheskogo statsionara. Sovremennye tekhnologii v meditsine 2009; № 2: 53–56. [in Russian]

12. Бархатова Н.А. Динамика резистентности возбудителей локальных и генерализованных форм инфекций мягких тканей. Казанский медицинский журнал. — 2009. — Т. 90. — № 3. — С. 385—390. / *Barkhatova N.A. Dinamika rezistentnosti возбуdiviteley lokalnykh i generalizovannykh form infektsiy myagkikh tkaney. Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* 2009; 90: 3: 385—390. [in Russian]
13. Коровин А.А., Базлов С.Б. Хронологическая изменчивость микрофлоры ран и антибактериальная терапия у больных с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей при сахарном диабете. Инфекции в хирургии. — 2008. — Т. 6. — № 4. — С. 47—50. / *Korovin A.A., Bazlov S.B. Khronologicheskaya izmenchivost mikroflory ran i antibakterialnaya terapiya u bolnykh s gnoyno-nekroticheskimi porazheniyami nizhnikh konechnostey pri sakharnom diabete. Infektsii v khirurgii* 2008; 6: 4: 47—50. [in Russian]
14. Mainul H., Massimo Sartelli, Judy McKimm, Muhamad Abu Bakar. Health care-associated infections — an overview. *Infect Drug Resist* 2018; 11: 2321—2333.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Липатов Константин Владимирович — д. м. н., профессор кафедры общей хирургии лечебного факультета Первого московского медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

Комарова Елена Александровна — к. м. н., ассистент кафедры общей хирургии лечебного факультета Первого московского медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

Хрупкин Валерий Иванович — д. м. н., профессор кафедры общей хирургии лечебного факультета Первого московского медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

Черкасов Юрий Евгеньевич — ассистент кафедры общей хирургии лечебного факультета Первого московского медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

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

Дехисси Екатерина Игоревна — к. м. н., ассистент кафедры общей хирургии лечебного факультета Первого московского медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

Эффективность использования ремаксола в терапии сопровождения при запущенном туберкулёзе

В. М. КОЛОМИЕЦ¹, А. Л. КОВАЛЕНКО², *Е. В. ТАЛИКОВА³

¹ Курский государственный медицинский университет, Курск

² Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург

³ Санкт-Петербургский медико-социальный институт, Санкт-Петербург

Efficiency of Remaxol Use in Supporting Treatment of Advanced Tuberculosis

V. M. KOLOMIETS¹, A. L. KOVALENKO², *E. V. TALIKOVA³

¹ Kursk State Medical University, Kursk

² Institute of Toxicology, Federal Biomedical Agency, St. Petersburg

³ St. Petersburg Medical and Social Institute, St. Petersburg

Цель исследования — изучение эффективности включения ремаксола в схему терапии сопровождения при лечении больных фиброзно-кавернозной формой лекарственно-устойчивого туберкулёза. Проведён анализ терапии 173 пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких. У всех пациентов были проведены стандартные общеклинические и лабораторные исследования, лучевая диагностика и определён спектр чувствительности возбудителя к противотуберкулёзным препаратам. Изменения иммунного статуса и состояния дезинтоксикационной функции печени оценивали в динамике (до и после курса гепатопротекторной терапии) — по уровню цитокинов (интерлейкины 1, 4, 6 и 10, фактор некроза опухоли, интерферона-гамма) и печёночных ферментов (АСТ, АЛТ). Методом рандомизации были сформированы две группы больных: группа 1 (основная), 111 пациентов которой получили этиотропную терапию и комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий, и группа 2 (сравнения) — 62 пациента, получившие помимо основного комплекса терапии ремаксол: внутривенно капельно, через день, 400 мл 1 раз в сутки, курс 12 капельниц. В результате проведённых исследований было выявлено, что при включении в схемы терапии сопровождения ремаксола отмечен выраженный гепатопротекторный (улучшение показателей трансаминаз) и незначительный иммунопротективный (положительная динамика цитокинового профиля) эффекты. Полученные лабораторные результаты соотносятся с клиническими данными: преобладанием высокой (53,8%) и отсутствием низкой эффективности лечения и более высокой степенью приверженности больных лечению.

Ключевые слова: фиброзно-кавернозный туберкулёз лёгких, противотуберкулёзная терапия, ремаксол, приверженность лечению, терапия сопровождения.

The aim of this study was to evaluate effectiveness of remaxol inclusion in the supporting therapy regimen in patients with the fibrous-cavernous form of drug-resistant tuberculosis. Treatment of 173 patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis was analyzed. Standard clinical laboratory methods and x-ray diagnostic were conducted in all patients as well as the spectrum of pathogen sensitivity to anti-tuberculosis drugs was defined. Changes in immune status and state of liver detoxification function were evaluated in dynamics (before and after hepatoprotective therapy course) taking in consideration level of cytokines (interleukins 1,4,6 and 10, tumor necrosis factor, interferon-gamma) and liver enzymes (AST, ALT). Two groups of patients were formed using randomization: group 1 (main) with 111 patients who received etiotropic therapy and complex of treatment and rehabilitation activities, and group 2 (comparisons) with 62 patients who, in addition to the main complex of therapy, received remaxol: intravenously, 400 ml once a day, a course of 12 droppers. In this research it was revealed that remaxol inclusion in the supporting treatment regimen showed hepatoprotective (improved transaminase) and minor immunoprotective (positive cytokine profile) effects. The obtained laboratory results correlate with clinical data: prevalence of high (53.8%) and absence of low treatment efficacy cases and a higher degree of patients adherence to treatment.

Keywords: fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis, anti-tuberculosis therapy, Remaxol, adherence to treatment, supporting treatment.

Введение

В настоящее время эпидемическая ситуация по туберкулёзу в России всё ещё далека от прогнозируемой, одним из факторов достижения и поддержания её стабилизации является интенсификация

лечения, как основного противоэпидемического мероприятия, позволяющего снизить экономическое бремя туберкулёза [1, 2]. Эффективность стандартизированной этиотропной терапии в течение последних лет, несмотря на внедрение новых режимов и препаратов, повышается крайне медленно. Так, лишь к концу выполнения Федеральной целевой программы закрытие полостей распада на фоне применения стандарт-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: e.talikova@mail.ru

ных режимов химиотерапии составляло среди впервые выявленных больных не более чем 61,5% (в 2005 г. — в 37,2%), у больных с рецидивом туберкулёза этот показатель еще ниже (у 41,7%) [3]. Особую тревогу вызывает низкая эффективность этиотропной терапии (ЭТ) у больных с выраженными необратимыми морфологическими (деструктивными, по данным лучевых методов исследования) изменениями в поражённом органе — основных источников инфекции [4, 5]. В свое время в отечественной фтизиатрии предлагалось рассматривать эту категорию пациентов как больных с запущенным туберкулёзом, относя к ним приоритетно больных фиброзно-кавернозным (ФКТЛ), кавернозным и цирротическим туберкулёзом [6]. Кроме того, отмечено что именно у пациентов с запущенными формами туберкулёза наиболее часто определяется лекарственная устойчивость возбудителя (ЛУ МБТ). Лечение лекарственно-устойчивого туберкулёза (ЛУ ТБ) в новой стратегии ВОЗ придаётся приоритетное значение [7, 8]. В нашей стране эффективность лечения больных с ЛУ ТБ является одним из основных целевых индикаторов Государственной программы развития здравоохранения России до 2020 г. [9].

При ФКТЛ, как хроническом воспалительном процессе, развивается вторичная иммунная недостаточность, что наряду с несостоятельностью компенсаторных механизмов обуславливает развитие тяжёлого деструктивного процесса с формированием множественных полостей распада и неэффективностью специфической терапии [10, 11]. Изменяется не только количество различных иммунокомпетентных клеток [12], но нарушается их функциональная активность и регуляция цитокинов [13, 14]. Кроме того, лечение больных с запущенным туберкулёзом, крайне малоэффективно не только из-за наличия у них лекарственноустойчивых форм возбудителя, но и из-за низкой приверженности лечению [15, 16].

Важно и то, что в связи с включением в схемы терапии данных пациентов противотуберкулёзных препаратов резервного ряда возрастает частота побочных реакций (особенно — снижение дезинтоксикационной функции печени), в связи с чем эффективность современных методов лечения запущенного туберкулёза на примере ФКТЛ, даже при использовании новых режимов этиотропной терапии ниже ожидаемых [17]. Всё перечисленное выше подтверждает необходимость подключения терапии сопровождения (ТС) [18, 19], в частности, препаратов с гепатопротекторными свойствами. Одним из таких препаратов является ремаксол (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург). Входящие в его состав метионин, никотинамид, рибоксин,

янтарная кислота, обеспечивают гепатотропное, антигипоксическое, антихолестатическое, мембраностабилизирующее и иммунокорректирующее действие [20—23].

Цель исследования — изучение эффективности включения ремаксол в схему терапии сопровождения при лечении больных фиброзно-кавернозной формой лекарственно-устойчивого туберкулёза.

Материал и методы

Проведён анализ терапии 173 пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких. Критерии включения: возраст пациентов от 20 до 70 лет, наличие верифицированного диагноза ФКТЛ, проведение основного курса лечения в интенсивной фазе (ИФ ОКЛ), информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: возраст моложе 20 лет, наличие злокачественных новообразований, отсутствие информированного согласия на участие в исследовании.

У всех пациентов были проведены стандартные общеклинические, лабораторные и исследования лучевыми методами, включая компьютерную томографию. Определён спектр лекарственной устойчивости возбудителя заболевания (ЛУ МБТ) молекулярно-генетическими методами, согласно Приказу МЗ РФ № 951 [24]. Изменения иммунного статуса и состояния дезинтоксикационной функции печени оценивали в динамике (до и после курса гепатопротекторной терапии) — по уровню цитокинов (интерлейкины (IL) 1, 4, 6 и 10, фактор некроза опухоли (TNF), интерферон-гамма (IFN)) и печёчных ферментов (АСТ, АЛТ).

При проведении этиотропной терапии (ЭТ) использованы стандартные режимы, ориентированные на рекомендации ВОЗ (программа DOTS и DOTS+).

С целью выяснения факторов, влияющих на эффективность терапии, методом рандомизации были сформированы две группы больных: группа 1 (основная), 111 пациентов которой получили этиотропную терапию и комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий, и группа 2 (сравнения) — 62 пациента, получившие помимо основного комплекса терапии ремаксол: внутривенно капельно, через день, 400 мл 1 раз в сутки, курс 12 капельниц.

В целях определения уровня приверженности лечению больных (ПБЛ) использовали авторскую методику [25]. Больному предлагалась специальная анкета, составленная таким образом, чтобы выявить не только объективные факторы, мешающие лечению (побочное действие лекарств, отсутствие контакта с медперсоналом), но и дать оценку таких субъективных факторов, как стресс, фрустрация, стигматизация, пристрастие к алкоголю и др. Язык предложенной анкеты доступен и свободен, количество вопросов ограничено, респондент не решает при анкетировании сложных задач.

Эффективность этиотропной терапии исследовали в динамике на 2-, 3- и 5-м месяце интенсивной фазы основного курса лечения (ИФ ОКЛ) учитывали по критериям в соответствии с клиническими рекомендациями и нормативными требованиями (приказ МЗ РФ №50): высокая (прекращение бактериовыделения и выраженная динамика данных клинического обследования лучевыми методами), средняя (продолжающееся бактериовыделение при прогрессировании); низкая (прерывание ИФ ОКЛ на фоне клинического улучшения).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием персонального компьютера и пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Доверительный интервал (ДИ) представлял собой диапазон значений, который с определённой вероятностью ($\alpha=0,05$ или 95%) включал в себя настоящее популяционное значение, $p<0,05$ принимали за величину уровня статистической значимости.

Таблица 1. Динамика трансаминаз у пациентов с ФКТЛ на фоне терапии сопровождения в интенсивной фазе основного курса лечения ($M \pm m$)

Группы	АСТ			АЛТ		
	ИУ	ОУ	% снижения	ИУ	ОУ	% снижения
I ($n=111$)	32,50 $\pm$ 1,5	28,21 $\pm$ 1,6	-13,20	24,69 $\pm$ 0,7	22,09 $\pm$ 1,3	-10,54
II ($n=62$)	38,51 $\pm$ 2,1	29,34 $\pm$ 1,3	-23,82	27,49 $\pm$ 1,5	18,33 $\pm$ 0,8	-25,76

Примечание. Здесь и в табл. 2: ИУ — исходный уровень; ОУ — уровень окончания курса гепатопротекторной терапии.

Таблица 2. Динамика уровня цитокинов в зависимости от схемы терапии сопровождения в интенсивной фазе основного курса лечения ($M \pm m$)

Группы	Сроки обследования	Показатель					
		IL-1	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFN
Группа 1	ИУ	13,7 $\pm$ 1,1	14,1 $\pm$ 1,1	23,5 $\pm$ 2,2	35,7 $\pm$ 1,6	10,2 $\pm$ 4,6	5,8 $\pm$ 0,8
	УО	11 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 1,1	15,5 $\pm$ 1,6	30,8 $\pm$ 1,7	6,2 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,6
	% снижения	-20%	-19%	-35%	-20%	-40%	-8%
Группа 2	ИУ	14,7 $\pm$ 1,6	13,5 $\pm$ 1,2	23,9 $\pm$ 2,3	33,8 $\pm$ 1,62	11,3 $\pm$ 4,5	4,9 $\pm$ 0,6
	УО	10,2 $\pm$ 0,8	10,5 $\pm$ 1,3	14,5 $\pm$ 2,6	24,8 $\pm$ 2,6	6,8 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,7
	% снижения	-31%	-22%	-39%	-26%	-39%	-26%

Результаты и обсуждение

Большинство обследованных больных (143 — 82,6%) были в возрасте 30–49 лет (95% ДИ 80,8–91,6), из них 22 (12,7%) женщины (95% ДИ 6,2–20,5).

Анализ социального статуса пациентов показал, что, несмотря на работоспособный возраст, 82% (95% ДИ 83,0–95,9) пациентов не работали, а в 40% (95% ДИ 32,8–52,2) — в течение от 2 до 4 лет в прошлом находились в местах лишения свободы.

У 72% (95% ДИ 60,5–78,8) больных имелись выраженные клинические проявления заболевания, симптомы интоксикации в различных сочетаниях встречались практически у всех больных, кашель с мокротой отмечался в 94% (95% ДИ 84,2–98,2), одышка — в 54% (95% ДИ 46,2–64,4), боли в грудной клетке — в 38% (95% ДИ 21,2–39,5) и кровохарканье — в 14% (95% ДИ 4,1–17,0) случаев. У 12,9% больных процесс в лёгких был двусторонним, а в 38,8% случаев занимал все лёгкое.

Анализ характера бактериовыделения выявил множественную лекарственную устойчивость возбудителя у большинства (127 пациентов — 73,4%) больных, из них 68 (61,2%) человек были в первой и 59 (95,1%) — во второй группе.

Развитие нежелательных (побочных) реакций гепатотоксического характера на фоне противотуберкулёзной терапии было отмечено у 108 (62,5%) пациентов. При этом 46 больных оказались в первой группе и получили стандартную терапию сопровождения, 62 пациента оказались во 2-й группе и получили препарат ремаксол.

Анализ динамики лабораторных данных выявил более выраженную положительную динамику показателей печёночной активности у больных, получивших курс ремаксол, что проявлялось в существенном снижении уровня трансаминаз (табл. 1).

При сравнении цитокинового статуса пациентов в зависимости от схемы терапии сопровожде-

ния отмечена положительная динамика у пациентов, получивших ремаксол, характеризующаяся нормализацией уровня показателей, представленных в табл. 2.

Анализ анкетирования на предмет приверженности больных лечению (ПБЛ) выявил, что до лечения показатели существенно не различались: 4,5 стенов в группе 1 и 4,9 — в группе 2 ($p > 0,05$). После окончания интенсивной фазы основного курса терапии у больных 1-й группы число прервавших или окончивших ИФ ОКЛ с низкой эффективностью, то есть с низкой приверженностью составило 22,5% (25 человек) а количество стенов снизилось до 3,3 стенов, в то время как в группе 2 — 10 (16,1%) человек и количество стенов повысилось до 5,7 стенов ($p > 0,05$).

Проведённый комплексный корреляционный анализ параметров состояния больных и их влияния на эффективность проводимой терапии выявил слабо выраженные достоверные связи между рядом показателей: так отмечено, что возраст пациентов существенно не влиял на результаты лечения; эффективность используемого режима этиотропного лечения, а, следовательно, и частота развития нежелательных реакций на него, тесно связаны со спектром устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам ($r = +0,496$) и сопутствующими заболеваниями ($r = +0,183$) и обратно связан с выраженностью приверженности лечению ($r = -0,395$). Кроме того, статистически подтверждено, что развитие нежелательных реакций существенно влияло на низкий эффект лечения ($r = +0,448$) и отрицательно сказывалось на отношениях с медперсоналом ($r = +0,229$).

Оценка клинической эффективности проведённой терапии в динамике выявила, что, несмотря на выбывших из исследования на заключительном этапе пациентов, более выраженный положительный результат через 5 мес. терапии был достигнут при включении в схему препарата ремаксол, причём наибольшая эффективность схем

Таблица 3. Эффективность терапии туберкулёза в зависимости от схемы лечения

Группа	Характер процесса	Эффективность терапии, абс. (%)			Всего
		высокая	средняя	низкая	
Группа 1 (n=86)	Впервые выявленное заболевание	24 (60)	14 (35)	2 (5)	40
	Рецидив	5 (55,5)	4 (44,5%)		9
	Хронизация процесса	16 (43,2)	19 (51,3)	2 (5,5)	37
	Всего	45	37	4	
Группа 2 (n=52)	Впервые выявленное заболевание	14(70)	6 (30)		20
	Рецидив	3 (75)	1 (25)		4
	Хронизация процесса	11 (39,3)	17 (60,7)		28
	Всего	28	24	—	

отмечена у пациентов с впервые выявленным туберкулёзным процессом (табл. 3).

Применение новых схем терапии туберкулёза, обусловленного ЛУ МБТ и, как следствие, развитие нежелательных реакций на неё, обусловило введение в схемы терапии сопровождения таких пациентов препаратов с гепатопротекторными свойствами [3, 4, 18]. Одним из таких препаратов является ремаксол. Детоксицирующая активность препарата обеспечивается стимуляцией оттока желчных кислот, предотвращая застой желчи, в результате происходит восстановление функций печени без изменений реологических свойств крови. Кроме того, препарат обладает клинически подтверждёнными антигипоксическими, антиоксидантными и цитопротекторными свойствами [20–23], что получило подтверждение и результатами данного исследования. При сравнении эффективности схем терапии сопровождения на фоне проведения основного курса лечения в интенсивной фазе у пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких, обусловленном лекарственно-устойчивыми *M.tuberculosis*, отмечена большая эффективность схемы, включающей ремаксол. У пациентов, получивших препарат по схеме: внутривенно капельно, через день, 400 мл

1 раз в сутки, курс 12 капельниц, отмечен выраженный гепатопротекторный (улучшение показателей трансаминаз) и незначительный иммунопротективный (положительная динамика цитокинового профиля) эффекты. Полученные лабораторные результаты соотносятся с клиническими данными: преобладанием высокой (53,8%) и отсутствием случаев низкой эффективности лечения.

Заключение

При включении в схемы терапии сопровождения в рамках основного курса этиотропного лечения пациентов с лекарственно-устойчивым фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких ремаксол по схеме: внутривенно капельно, через день, 400 мл 1 раз в сутки, курс 12 капельниц, отмечен выраженный гепатопротекторный (улучшение показателей трансаминаз) и незначительный иммунопротективный (положительная динамика цитокинового профиля) эффекты. Полученные лабораторные результаты соотносятся с клиническими данными: преобладанием высокой (53,8%) и отсутствием случаев низкой эффективности лечения и более высокой степенью приверженности больных лечению.

ЛИТЕРАТУРА

- Васильева И. А., Белюловский Е. М., Борисов С. Е., Стерликов С. А. Заболеваемость, смертность и распространённость показатели бремени туберкулёза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и распространённость туберкулёза Туберкулёз и болезни лёгких. — 2017. — № 6. — С. 9–21. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-9-21 / Vasileva I. A., Belilovskiy E. M., Borisov S. E., Sterlikov S. A. Zabolevaemost, smertnost i rasprostranennost pokazately bremeni tuberkuleza v regionakh VOZ, stranakh mira i v Rossiyskoy Federatsii. CHast 1. Zabolevaemost i rasprostranennost tuberkuleza Tuberkulez i bolezni legkikh 2017; 6: 9–21. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-9-21 [in Russian]
- Коломиец В. М. Современные оценки эпидемической ситуации по туберкулёзу. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2011. — № 4. — С. 200–201. / Kolomiets V. M. Sovremennye otsenki epidemicheskoy situatsii po tuberkulezu. Tuberkulez i bolezni legkikh 2011; 4: 200–201. [in Russian]
- Васильева И. А., Эргешов А. Э., Самойлова А. Г., Киселева Ю. Ю., Иванов А. К., Яблонский П. К. Отдалённые результаты применения стандартных режимов химиотерапии у больных туберкулёзом органов дыхания Туберкулёз и болезни лёгких. — 2012. — № 4. — С. 3–8. / Vasileva I. A., Ergeshov A. E., Samoylova A. G., Kiseleva Yu. Yu., Ivanov A. K., Yablonskiy P. K. Otdalennyye rezultaty primeneniya standartnykh rezhimov khimioterapii u bolnykh tuberkulezom organov dykhaniya Tuberkulez i bolezni legkikh 2012; 4: 3–8. [in Russian]
- Гельберг И. С., Вольф С. Б., Алексю Е. Н., Авласенко В. С., Коломиец В. М., Коноркина Е. А. Факторы риска развития туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Курский научн.-практич. вестн. «Человек и его здоровье». — 2015. — № 1. — С. 17–22. / Gelberg I. S., Volf S. B., Alekso E. N., Avlasenko V. S., Kolomiets V. M., Konorkina E. A. Faktory riska razvitiya tuberkuleza s mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivostyu vzbuditelya. Kurskiy nauchn.-praktich. vestn. «Chelovek i ego zdorove». 2015; 1: 17–22. [in Russian]
- Шилова М. В. Туберкулёз в России в 2012–2013 году. М.: Промобюро, 2014. / Shilova M. V. Tuberkulez v Rossii v 2012–2013 godu. M.: Promobyuro, 2014. [in Russian]
- Туберкулёз. Руководство для врачей / под ред. Хоменко А. Г. М.: Медицина, 1996. / Tuberkulez. Rukovodstvo dlya vrachey / pod red. K.Homenko A. G. M.: Meditsina, 1996. [in Russian]
- Равильон Р. К., Коробитин А. А. Ликвидация туберкулёза — новая стратегия ВОЗ в эру устойчивого развития, вклад Российской Федерации. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2016. — № 11. — С. 7–15. / Ravilon R. K., Korobitsin A. A. Likvidatsiya tuberkuleza — novaya strategiya VOZ v eru ustoychivogo razvitiya, vklad Rossiyskoy Federatsii. Tuberkulez i bolezni legkikh 2016; 11: 7–15. [in Russian]
- WHO handbook for guideline development. Geneva: World Health Organization, 2012.
- Нечаева О. Б., Стерликов С. А., Хуриева Н. Б. Целевые индикаторы и показатели государственной программы развития здравоохранения России до 2020 года. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2014. — № 12. — С. 200–201. / Nechaeva O. B., Sterlikov S. A., Khurueva N. B. TSelevye indikatory i pokazately gosudarstvennoy programmy razvitiya zdravookhraneniya Rossii do 2020 goda. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2014; 12: 200–201.
- Туберкулёз: патогенез, защита, контроль/ под ред. Б. Р. Блума. М.: Медицина, 2002. / Tuberkulez: patogenez, zashchita, kontrol/ pod red. B. R. Bluma. M.: Meditsina, 2002.
- Kaufmann S. H., Hahn H. Mycobacteria and TB. Berlin, 2003. [in Russian]
- Lee J., Hartman M., Kornfeld H. Macrophage apoptosis in tuberculosis Yonsei Med. J. 2009; 50 (1): 1–11. [in Russian]
- Кноринг Б. Е., Давыдова Н. И. Цитокины как предиктор развития процесса при фиброзно-кавернозном туберкулёзе лёгких. Медицинский

- альянс. — 2014. — № 4. — С. 21—36. / *Knoring B.E., Davydova N.I.* Tsitokiny kak prediktor razvitiya protsessa pri fibrozno-kavernoznom tuberkuleze legkikh. *Meditsinskiy alyans* 2014; 4: 21—36. [in Russian]
14. *Чернушенко Е. Ф., Коган Л. П., Панасюкова О. Р., Петушкова В. Н., Цыганкова Л. М.* Цитокины в оценке иммунной системы у больных туберкулезом легких. *Украинский пульмонологический журнал*. — 2010. — № 2. — С. 39—43. / *Chernushenko E. F., Kogan L. P., Panasyukova O. R., Petushkova V. N., Tsygankova L. M.* Tsitokiny v otsenke immunoynoy sistemy u bolnykh tuberkulezom legkikh. *Ukrainskiy pulmonologichnyi zhurnal* 2010; 2: 39—43. [in Russian]
 15. *Богородская, Е. М., Смердин С. В., Стерликов С.А.* Организационные аспекты лечения больных туберкулезом в современных социально-экономических условиях М.: 2011. / *Bogorodskaya, E. M., Smerdin S. V., Sterlikov S.A.* Organizatsionnye aspekty lecheniya bolnykh tuberkulezom v sovremennykh sotsialno-ekonomicheskikh usloviyakh M.: 2011. [in Russian]
 16. *Касаева Т. Ч., Габбасова Л. А., Васильева И. А., Москалева А. А.* Туберкулез в Российской Федерации, 2012 / 2013 и 2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М.: 2015. — С. 11—22. / *Kasaeva T. CH, Gabbasova L. A., Vasilieva I. A., Moskaeva A. A.* Tuberkulez v Rossiyskoy Federatsii, 2012 / 2013 i 2014 gg. Analiticheskiy obzor statisticheskikh pokazateley, ispol'zue-mykh v Rossiyskoy Federatsii i v mire. M.: 2015; 11—22. [in Russian]
 17. *Боровицкий В. С.* Современные методы лечения хронических деструктивных форм туберкулеза на примере фиброзно-кавернозного туберкулеза легких Пульмонология. — 2014. — № 1. — С. 102—108. / *Borovitskiy V. S.* Sovremennyye metody lecheniya khronicheskikh destruktivnykh form tuberkuleza na primere fibrozno-kavernoznogo tuberkuleza legkikh *Pulmonologiya* 2014; 1: 102—108. [in Russian]
 18. *Иванова Д. А., Борисов С. Е.* Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулезом. Туберкулез и болезни легких. — 2017. — № 95 (6). — С. 22—29. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-22-29 / *Ivanova D. A., Borisov S. E.* Spektr i faktory riska nezhelatelnykh pobochnykh reaktsiy pri lechenii vperve vyavlennykh bolnykh tuberkulezom *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2017; 95 (6): 22—29. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-22-29 [in Russian]
 19. *Баласанянц Г.С., Галкин В.Б., Новиков Г.А., Рудой С.В., Асеев А.В., Карпов А.В.* Оказание паллиативной помощи больным туберкулезом. Медицинский альянс. — 2014. — № 4. — С. 2—18. / *Balasanyants G.S., Galkin V.B., Novikov G.A., Rudoy S.V., Aseev A.V., Karpov A.V.* Okazanie palliativnoy pomoshchi bolnym tuberkulezom. *Meditsinskiy alyans* 2014; 4: 2—18. [in Russian]
 20. *Суханов Д.С.* Эффективность гепатопротекторного действия и оценка риска при использовании реамберина, ремаксола и адеметионина у больных туберкулезом органов дыхания с лекарственными пораже-ниями печени. *Терапевтический архив*. — 2012. — № 11. — С. 26—29. / *Sukhanov D.S.* Effektivnost hepatoprotektornogo deystviya i otsenka riska pri ispol'zovanii reamberina, remaksola i ademetionina u bolnykh tuberkulezom organov dykhaniya s lekarstvennymi porazheniyami pecheni. *Terapevticheskiy arkhiv* 2012; 11: 26—29. [in Russian]
 21. *Коваленко А.Л., Петров А.Ю., Суханов Д.С., Саватеева Т.Н., Романцов М.Г.* Ремаксол — препарат для восстановления системы антиоксидантной защиты при поражении печени циклофосфаном в эксперименте. Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2011. — № 1. — С. 32—35. / *Kovalenko A.L., Petrov A.YU., Sukhanov D.S., Savateeva T.N., Romantsov M.G.* Remaksol — preparat dlya vosstanovleniya sistemy antioksidantnoy zashchity pri porazhenii pecheni tsiklofosfanom v eksperimente. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2011; 1:32—35. [in Russian]
 22. *Стельмах В.В., Козлов В.К., Иванова В.Ф., Самусенко И.А.* Эффективность инфузионного гепатотропного препарата ремаксол в патогенетической терапии хронических вирусных гепатитов на цирротической стадии. *Терапевтический архив*. — 2015. — № 8. — С. 67—72. DOI: 10.17116/terarkh201587867-72 / *Stelmakh V.V., Kozlov V.K., Ivanova V.F., Samusenko I.A.* Effektivnost infuzionnogo hepatotropnogo preparata remaksol v patogeneticheskoy terapii khronicheskikh virusnykh hepatitov na tsirroticheskoy stadii. *Terapevticheskiy arkhiv* 2015; 8: 67—72. DOI: 10.17116/terarkh201587867-72 [in Russian]
 23. *Волчегорский И.А., Новоселов П.Н., Ушкарёва Э.В.* Влияние ремаксола на эффективность стандартного лечения больных инфильтративным туберкулезом легких. *Терапевтический архив*. — 2016. — № 3. — С. 73—78 DOI: 10.17116/terarkh201688373-78 / *Volchegorskiy I.A., Novoselov P.N., Ushkareva E.V.* Vliyanie remaksola na effektivnost standartnogo lecheniya bolnykh infiltrativnym tuberkulezom legkikh. *Terapevticheskiy arkhiv* 2016; 3: 73—78 DOI: 10.17116/terarkh201688373-78 [in Russian]
 24. Приказ Минздрава РФ от 29 декабря 2014 г. № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания». URL: <http://docs.cntd.ru/document/420248060> (дата обращения: 08.09.2016). / Prikaz Minzdrava RF ot 29 dekabrya 2014 g. № 951 «Ob utverzhdenii metodicheskikh rekomendatsiy no sovershenstvovaniyu diagnostiki i lecheniya tuberkuleza organov dykhaniya». URL: <http://docs.cntd.ru/document/420248060> (data obrashcheniya: 08.09.2016). [in Russian]
 25. Способ повышения эффективности лечения больных туберкулезом. Патент на изобретение № 2611398. Россия. Регистрация в Государственном регистре изобретений РФ 21.02.2017. / Sposob povysheniya effektivnosti lecheniya bolnykh tuberkulezom. Patent na izobretenie № 2611398. Rossiya. Registratsiya v Gosudarstvennom registre izobreteniy RF 21.02.2017. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Коломиец Владислав Михайлович — д. м. н., профессор, ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск

Коваленко Алексей Леонидович — д. б. н., к. х. н., ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Таликова Екатерина Владимировна — к. м. н., ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург

Возможности и перспективы применения цитофлавина для повышения резервов адаптации специалистов, работающих в горных условиях

В. П. ГАНАПОЛЬСКИЙ¹, *В. О. МАТЫЦИН¹, С. С. ГРИНЧУК¹,
А. Н. ЯТМАНОВ¹, В. Ф. ЛОПАТИНА¹, В. А. ЗАПЛУТАНОВ²

¹ Научно-исследовательский центр Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Opportunities and Perspectives of the Use of Cytoflavin for Increasing the Adaptational Reserves of Experts Working in the Mountain Conditions

V. P. GANAPOLSKIY¹, V. O. MATYTSIN¹, S. S. GRINCHUK¹, A. N. YATMANOV¹, V. F. LOPATINA¹, V. A. ZAPLUTANOV²

¹ S. M. Kirov Military medical academy, Saint Petersburg

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg

При осуществлении профессиональной деятельности специалистов в условиях горной местности, связанной с физическими и психоэмоциональными нагрузками, приобретают важную роль мероприятия, направленные на адаптацию организма к высотной гипоксии, такие как проведение гипоксических тренировок в естественных условиях горной местности и моделирование гипоксической гипоксии путём использования гипобарических камер либо гипоксикаторов, моделирующих нормобарическую гипоксию и применение фармакологической коррекции, позволяющей быстро мобилизовать либо экономизировать ресурсы организма. Антигипоксикант/антиоксидант цитофлавин, успешно применяющийся в терапии болезней нервной системы, как предполагается, может быть применен для улучшения физической работоспособности и психомоторных функций у профессионалов, работающих в условиях горной местности. Проведено пилотное исследование с участием альпинистов, которым выполнили курс гипоксических гипобарических тренировок с фармакокоррекцией трекрезаном и цитофлавином. Выявлена тенденция к повышению уровня и концентрации внимания у спортсменов, получавших фармакокоррекцию, в отличие от принимавших плацебо. Выявленные положительные тенденции психомоторных показателей в сочетании с хорошей переносимостью препарата являются основанием для планирования дальнейших исследований.

Ключевые слова: цитофлавин, гипоксия, альпинисты, физическая работоспособность, барокамерный подъём, гипоксическая тренировка, внимание.

When carrying out professional activities of specialists in mountainous conditions associated with physical and psycho-emotional stress, measures aimed at adapting the body to high altitude hypoxia, such as conducting hypoxic training both in natural mountainous areas and modeling hypoxic hypoxia using hypobaric chambers or hypoxicators simulating normobaric hypoxia and the use of pharmacological correction that allows to mobilize either economize resources of the organism. The antihypoxant / antioxidant cytoflavin, successfully used in the treatment of diseases of the nervous system, is supposed to be used to improve physical performance and psychomotor functions among professionals working in mountainous areas. The authors conducted a pilot study with the participation of climbers, who completed a course of hypoxic hypobaric training with the pharmacocorrection of trecrezan and cytoflavin. Revealed a tendency to increase the level and concentration of attention in athletes who received pharmacocorrection, in contrast to taking placebo. The identified positive trends in psychomotor performance combined with good tolerability of the drug are the basis for planning further research.

Keywords: cytoflavin, hypoxia, climbers, physical performance, pressure chamber rise, hypoxic training, attention.

Введение

Горная местность является не только излюбленным местом отдыха и занятий спортом (горные лыжи, альпинизм, туризм и т.д.), но и зоной, где выполняются различные виды работ (спасательные службы, военные подразделения, горнодобывающая отрасль). Основным фактором, воздейст-

вующим на человека в горной местности, является высотная гипоксия. Обусловленная гипоксией горная болезнь способна вызывать в организме нарушения различной тяжести: от снижения работоспособности до развития отёка мозга [1]. Вторым важным повреждающим фактором в горной местности является холод, вызывающий локальные повреждения тканей, общее переохлаждение, а также усугубляющий действие высотной гипоксии [2].

Для осуществления полноценной профессиональной деятельности специалистов в условиях горной местности, в особенности связанной с ин-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: e-mail: matitsin@list.ru

тенсивными физическими и психоэмоциональными нагрузками, важную роль приобретают профилактические мероприятия направленные на адаптацию организма к высотной гипоксии, такие как проведение гипоксических тренировок как в естественных условиях горной местности, так и с помощью моделирования гипоксической гипоксии в гипобарических камерах или гипоксикаторах, моделирующих нормобарическую гипоксию. Исследования показали, что любые варианты моделирования высотной гипоксии являются эффективными и адекватными, поэтому отпадает необходимость вывозить тренируемый контингент в горную местность [3]. При проведении адаптивных тренировок традиционно применяют периодические гипоксические воздействия (ежедневно либо через день), продолжительность курса составляет 2—4 нед. [4, 5]. Оптимальные условия для гипоксических тренировок моделируют парциальное давление кислорода в воздухе, соответствующее высоте 2000—3000 м над уровнем моря (условия низко- и среднегорья). Показано, что курс прерывистых гипоксических тренировок в подобных условиях повышает выносливость и физическую работоспособность спортсменов, при этом в гипоксических условиях спортсменам рекомендовано находиться в условиях покоя, а физические тренировки выполнять в естественных нормоксических условиях [6]. В то же время отмечено, что проведение прерывистых гипоксических тренировок в условиях, соответствующих высотам 4000—5000 м не приводит к повышению физической работоспособности спортсменов [7]. Есть мнение, что оптимальными для гипоксических тренировок являются условия, моделирующие высоты не более 2000 м, поскольку превышение высотного режима может вызывать явления окислительного стресса, повышать энерготраты, что приводит к нарушению процессов адаптации [8]. Курсовое применение гипоксических тренировок используется не только для повышения адаптационных резервов спортсменов и специалистов, но также находит применение в клинической медицине — в целях лечения и реабилитации пациентов с рядом соматических заболеваний (гипертоническая болезнь, метаболический синдром, ожирение и т. д.) [9—12]. Использование периодических гипоксических тренировок для адаптации к условиям горной местности требует продолжительного времени и повторов тренировочных циклов, поскольку процессы адаптации развиваются постепенно и требуют подкрепления [13].

Вместе с тем, возможно возникновение ситуации (поисково-спасательные операции, чрезвычайные ситуации), когда решение неотложной профессиональной задачи требует напряжения всего организма. Для подготовки к таким ситуациям, помимо систематических гипоксических

тренировок, может быть использован метод фармакологической коррекции, позволяющий быстро мобилизовать ресурсы организма повысить его устойчивость к гипоксии. Препараты этой группы (антиоксиданты/антигипоксанты) способствуют повышению утилизации кислорода тканями, вследствие чего они могут применяться при гипоксии любой природы. Одним из таких препаратов является цитофлавин (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»), в состав которого входят активные вещества: янтарная кислота (0,3 г), инозин (рибоксин, 0,05 г), никотинамид (0,025 г) и рибофлавин (0,005 г). Компоненты препарата активируют окислительно-восстановительные ферменты дыхательной цепи митохондрий, стимулируют дыхание и энергообразование в клетках, повышают утилизацию кислорода тканями, реактивируют ферменты антиоксидантной системы и уменьшают продукцию свободных радикалов. Препарат хорошо себя зарекомендовал при включении как в схемы терапии метаболических нарушений, развивающихся при цереброваскулярных нарушениях, астенического синдрома, в терапии когнитивных нарушений при токсических повреждениях мозга [14], так и для повышения работоспособности у спортсменов [15, 16].

Наряду с этим, адаптацию человека к холодным условиям горной местности может существенно облегчить включение в схемы фармакологической коррекции метеoadаптогенов, таких как трекрезан, возможность применения которого для быстрой и эффективной адаптации человека к холодной среде доказана на клиническом уровне [17].

Исходя из сказанного выше, представляет интерес изучение возможности применения цитофлавина в качестве антигипоксического компонента в комбинации с немедикаментозными адаптационными тренировками специалистов, в силу своей профессиональной деятельности подверженных влиянию факторов горной местности.

Цель исследования — оценка влияния на показатели физической работоспособности и психомоторной деятельности спортсменов-альпинистов включения в схемы подготовки цитофлавина и трекрезана в комбинации с курсом гипоксических гипобарических тренировок.

Материал и методы

В исследовании участвовали 15 спортсменов-альпинистов (мужчины) в возрасте 23—30 лет ($M=25$; $x_{\max}=30$, $x_{\min}=23$), с массой тела 63—85 кг ($M=76,8$; $x_{\max}=85,3$, $x_{\min}=63,2$) и ростом 167—182 см ($M=174,5$; $x_{\max}=182,5$, $x_{\min}=167$). Дизайн исследования одобрен независимым Этическим комитетом при ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ (протокол № 203 от 20 марта 2018 г.). Участников исследования случайным образом разделили на две группы: I группу (сравнения, $n=7$) — «плацебо» и II группу (основную, $n=8$), участники которой за 8 дней до начала курса гипоксических тренировок получили актопротектор трекрезан по схеме: первый день 200 мг трижды в

сутки, последующие 7 дней по 200 мг однократно, утром после еды; суммарная доза составила 2000 мг (10 таблеток). Далее одновременно с началом курса гипоксических тренировок добровольцы основной группы принимали цитофлавин по 2 таблетки (760 мг) 2 раза в сутки за 30 мин до еды, с интервалом между приёмами 8–10 ч, курс составил 8 дней.

Курс интервальных гипоксических гипобарических тренировок состоял из восьми барокамерных подъёмов в ежедневном режиме на термобарокомплексе «Табай» (Япония). Продолжительность каждого подъёма составила 60 мин; высота первого подъёма соответствовала 1500 м над уровнем моря; второго — 2000 м, 3–8-го подъёмов 2500 м. Участники размещались в камере в креслах.

Обследование участников проводилось исходно и по завершении исследования и включало:

1. Оценку физической работоспособности и выносливости спортсменов на велоэргометре Ergoline, подключенном к эргоспирометрической системе MetaLyser (Cortex, Германия). Определяли максимальное удельное потребление кислорода на килограмм массы тела ($\dot{V}O_2/\text{кг}$, мл/мин/кг) на пике физической нагрузки. Критериями максимальной физической нагрузки считали прекращение роста частоты сердечных сокращений и потребления кислорода при значении дыхательного коэффициента более 1.

2. Анализ психологического статуса спортсменов по показателям: актуальное состояние добровольцев, самооценка их активности, настроения, самочувствия с анализом возможных жалоб, состояние тревоги, волевые качества. Основной задачей психологического обследования явилась оценка уровня и концентрации внимания участников, которую выполняли с применением корректурной пробы Бурдона (в модификации Ландольта). Результаты пробы выражали в баллах производительности, максимальное количество набранных участником баллов не ограничивалось [18].

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ SPSS, STATISTICA-10 и «Microsoft Excel». Вычисляли медиану (Me) и разброс значений ($x_{\max}$ и $x_{\min}$). Для оценки различий применяли непараметрические критерии Вилкоксона (для связанных выборок) и Манна–Уитни (для несвязанных выборок) Статистически значимыми считали различия при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Физическая работоспособность: при исходном обследовании не было выявлено статистически значимых различий между показателями вентиляции и удельного потребления кислорода у спортсменов обеих групп, что указывает на однородность обеих выборок. При попарном сравнении результатов, полученных на пике физической нагрузки исходно и по завершении курса интервальной гипоксической гипобарической тренировки, выявлено статистически значимое повышение показателей максимального потребления кислорода на единицу массы после курса тренировок как у спортсменов, получавших плацебо на 5% (с 44 до 46 мл/мин/кг, $p=0,026$), так и у принимавших препараты на 7% (с 44 до 47 мл/мин/кг, $p=0,011$). Однако при межгрупповом сравнении средних тенденций значений $\dot{V}O_2/\text{кг}$ у спортсменов после курса гипоксической тренировки статистически значимых различий выявлено не было (46 мл/мин/кг у спортсменов первой группы и 47 мл/мин/кг — второй группы, $p > 0,05$).

Устойчивость и концентрация внимания: показано, что участники обеих групп характеризовались средними значениями показателей самооценки состояния, реактивной и личностной тревожности, волевых качеств, которые укладывались в нормативные значения для здоровых лиц и практически не претерпевали изменений после курса интервальных гипоксических тренировок.

Проведённое психологическое исследование и материалы собеседования показали положительное оценочное восприятие участия добровольцев в проводимых мероприятиях по гипоксической тренировке с фармакологической поддержкой. Нахождение в термобарокомплексе «Табай» не вызывало чувства дискомфорта, что может свидетельствовать о наличии субъективного ощущения быстрой психологической адаптации к проводимым исследованиям.

Однако у спортсменов обеих групп были выявлены закономерные изменения уровня внимания при выполнении усложнённого варианта корректурной пробы. У добровольцев группы плацебо выявлено увеличение количества зашифрованных колец (продуктивность) с 255 до 335 баллов ($p=0,011$), что свидетельствует о повышении продуктивности выполнения теста и, соответственно, устойчивости уровня внимания. Это можно объяснить результатом продолжающейся тренировки в ходе многократного выполнения теста.

Вместе с тем итоговая продуктивность корректурной пробы у добровольцев основной группы также показала повышение концентрации и устойчивости внимания (с 234,5 баллов до 298,5 баллов, $p=0,028$), причём сравнение итоговых результатов у спортсменов обеих групп не выявило статистически значимых различий по средней тенденции ($p < 0,05$).

Тем не менее, в таблице показано поминутное изменение продуктивности в корректурном тесте, где у спортсменов группы плацебо отмечаются статистически значимые изменения результатов теста со 2-й по 6-ю минуту; в то время как у спортсменов группы фармакотерапии статистически значимые изменения показателей продуктивности наблюдались уже с 1-й минуты и до 9-й. Исключения составили 5-я и 8-я минуты в связи с тем, что у отдельных добровольцев количество просмотренных и зашифрованных знаков существенно не возросло, что можно было отнести к влиянию случайного фактора.

Таким образом, наблюдалось поминутное увеличение числа статистически значимых изменений результатов продуктивности, а также их значимый рост с первой минуты корректурного теста, что указывает на тенденцию, способствующую повышению концентрации и устойчивости внимания под действием последовательного кур-

Поминутное изменение производительности в корректурном тесте на устойчивость и концентрацию внимания у альпинистов

Продуктивность	Группа плацебо (n=7, Ме [x _{min} ; x _{max}])		Группа фармакокоррекции (n=8, Ме [x _{min} ; x _{max}])	
	перед курсом тренировок	после курса тренировок	перед курсом тренировок	после курса тренировок
1-я минута	27 [18; 34]	32 [24; 44]	24 [11; 32]	33,5 [21; 40]*
2-я минута	24 [17; 30]	32 [24; 41]*	22,5 [17; 26]	28,5 [22; 37]*
3-я минута	24 [18; 24]	35 [25; 56]*	22 [18; 27]	28 [20; 38]*
4-я минута	26 [19; 29]	29 [27; 49]*	22,5 [17; 30]	28 [26; 37]*
5-я минута	23 [20; 30]	36 [25; 54]*	22,5 [17; 35]	29,5 [18; 37]
6-я минута	22 [20; 29]	35 [21; 57]*	25,5 [20; 27]	31,5 [23; 40]*
7-я минута	24 [20; 34]	37 [17; 54]	22,5 [18; 28]	29,5 [20; 39]*
8-я минута	28 [22; 41]	39 [24; 63]	25,5 [22; 37]	30 [19; 40]
9-я минута	29 [22; 48]	34 [28; 43]	24,5 [16; 37]	36 [23; 42]*
10-я минута	28 [23; 45]	37 [25; 46]	25,5 [16; 38]	33 [15; 38]

Примечание. Ме — медиана (центральное значение), [x_{min}; x_{max}] — разброс значений; * — статистически значимые различия (p<0,05) между показателями, полученными после курса гипоксической тренировки, по сравнению с исходными; для оценки различий использован U-критерий Манна-Уитни.

сового приёма трекрезана и цитофлавина. Вероятно, маленькие размеры выборок и большой разброс значений нивелируют различия, и для подтверждения этой тенденции необходимы дальнейшие исследования эффективности фармакокоррекции психомоторных функций у профессионалов, работающих в горной местности.

Отмеченную у добровольцев основной группы тенденцию к повышению концентрации и устойчивости внимания можно связать с включением в схемы подготовки цитофлавина и трекрезана. Нежелательных явлений на приём препаратов выявлено не было, все участники получили терапию в полном объеме.

Заключение

В настоящее время, цитофлавин, используемый как эффективное антигипоксическое/антиоксидантное средство при повреждениях нервной системы различного генеза, начинает находить применение в коррекции функционального состояния здоровых людей. Препарат включает в себя естественные метаболиты организма человека, поэтому является естественным для организма и нетоксичным, что позволяет без риска назначать его здоровым людям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Di Pasquale D.M., Strangman G.E., Harris N.S., Muza S.R. Acute mountain sickness symptoms depend on normobaric versus hypobaric hypoxia. *Bio Med Research Intern* 2016; Article ID 6245609: 9. <https://dx.doi.org/10.1155/2016/6245609>
2. Burtcher M., Gatterer H., Burtcher J., Mairbäur H. Extreme terrestrial environments: life in thermal stress and hypoxia. A narrative review. *Front Physiol* 2018; 16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00572>
3. Woods D.R., O'Hara J.P., Boos C.J., Hodgkinson P.D., Hill Neil E.D., Amanda J., Kelly H., Phillipson A., Hazlerigg N., Arjomandkhah L., Gallagher D., Holdsworth M., Cooke N., Green D.C. Markers of physiological stress during exercise under conditions of normoxia, normobaric hypoxia, hypobaric hypoxia, and genuine high altitude. *Eur J Appl Physiol* 2017; 117: 5: 893—900. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3573-5>
4. Kim S.-H., An H.-J., Choi J.-H., Kim Y.-Y. Effects of 2-week intermittent training in hypobaric hypoxia on the aerobic energy metabolism and performance of cycling athletes with disabilities. *J Phys Ther Sci* 2017; 29: 6: 1116—1120. <https://doi.org/10.1589/jpts.29.1116>
5. Vallier J.M., Chateau P., Guezennec C.Y. Effects of physical training in a hypobaric chamber on the physical performance of competitive triathletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996; 73: 5: 471—478.
6. Levine B.D. Intermittent hypoxic training: fact and fancy. *High Alt. Med. Biol.* 2002; 3: 2: 177—193. <https://doi.org/10.1089/15270290260131911>
7. Rodríguez F.A., Truijens M.J., Townsend N.E., Stray-Gundersen J., Gore C.J., Levine B.D. Performance of runners and swimmers after four weeks of intermittent hypobaric hypoxic exposure plus sea level training. *J Appl Physiol* 2007; 103: 5: 1523—1535. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01320.2006>
8. Irarrázaval S., Allard C., Campodónico J., Pérez D., Strobel P., Vásquez L., Urquiza I., Echeverría G., Leighton F. Oxidative stress in acute hypobaric hypoxia. *High Alt Med Biol* 2017. <https://doi.org/10.1089/ham.2016.0119>
9. Gutwenger I., Hofer G., Gutwenger A.K., Sandri M., Wiedermann C.J. Pilot study on the effects of a 2-week hiking vacation at moderate versus low altitude on plasma parameters of carbohydrate and lipid metabolism in patients with metabolic syndrome. *BMC Res Notes* 2015; 8: 103. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1066-3>

10. *Lippl F.J., Neubauer S., Schipfer S., Lichter N., Tufman A., Otto B., Fischer R.* Hypobaric hypoxia causes body weight reduction in obese subjects. *Obesity* (Silver Spring) 2010; 18: 4: 675–681. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.509>
11. *Marquez J.L., Rubinstein S., Fattor J. A., Shah O., Hoffman A.R., Friedlander A.L.* Cyclic hypobaric hypoxia improves markers of glucose metabolism in middle-aged men. *High Alt Med Biol* 2013; 14: 3: 263–272. <https://doi.org/10.1089/ham.2012.1057>
12. *Serebrovskaya T.V., Xi L.* Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases: Practical analysis on methods and equipment. *Exp Biol Med* (Maywood). 2016; 241: 15: 1708–1723. <https://doi.org/10.1177/1535370216657614>
13. *Wilber R.L.* Current trends in altitude training. *Sports Med* 2001; 31: 4: 249–265.
14. Цитофлавин. Сборник научных статей, опубликованных в периодической печати. СПб.: Тактик-Студио, 2008. / *Tsitoflavin. Sbornik nauchnykh statey, opublikovannykh v periodicheskoy pechati*. SPb.: Taktik-Studio, 2008. [in Russian]
15. *Черкасова В.Г., Чайников П.Н., Муравьев С.В., Кулеш А.М., Соломатина Н.В.* Клиническая эффективность лекарственного препарата цитофлавин в оптимизации вегетативной регуляции у волейболистов мужского пола. *Профилактическая медицина*. — 2018. — № 3. — С. 74–78 doi: 10.17116/profmed201821374 / *Cherkasova V.G., Chaynikov P.N., Muravev S.V., Kulesh A.M., Solomatina N.V.* Klinicheskaya effektivnost lekarstvennogo preparata tsitoflavin v optimizatsii vegetativnoy regulatsii u voleybolistov muzhskogo pola. *Profilakticheskaya meditsina* 2018; 3: 74–78 doi: 10.17116/profmed201821374 [in Russian]
16. *Ачкасов Е. Е., Куршев В. В., Заборова В.А., Небожжаева С. Ф.* Влияние ступенчатой терапии цитофлавином на динамику лабораторных показателей профессиональных спортсменов (хоккеистов) на первом этапе подготовки к игровому сезону Клиническая медицина. — 2018. — № 4. — С. 354–360. doi: 10.18821/0023-2149-2018-96-4-354-360 / *Achkasov E. E., Kurshev V. V., Zaborova V.A., Nebozhaeva S. F.* Vliyaniye stupenchatoy terapii tsitoflavinom na dinamiku laboratornykh pokazateley professionalnykh sportsmenov (khokkeistov) na pervom etape podgotovki k igrovomu sezonu Klinicheskaya meditsina 2018; 4: 354–360. doi: 10.18821/0023-2149-2018-96-4-354-360 [in Russian]
17. *Зарубина И.В., Ганопольский В.П., Шабанов П.Д.* Функциональные и метаболические изменения у здоровых добровольцев после воздействия холода и введения метеоадаптогена трекрезана. *Российский физиологический журнал им. Сеченова*. — 2008. — Т. 94. — № 1. — С. 62–67. / *Zarubina I.V., Ganapolskiy V.P., SHabanov P.D.* Funktsionalnye i metabolicheskie izmeneniya u zdorovykh dobrovol'tsev posle vozdeystviya kholoda i vvedeniya meteoadaptogena trekrezana. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. Sechenova*. 2008; Т. 94: № 1: 62–67. [in Russian]
18. *Крылов А.А., Маничев С.А.* Практикум по общей, экспериментальной и прикладной психологии. СПб.: Питер, 2000. / *Krylov A.A., Manichev S.A.* Praktikum po obshchey, eksperimental'noy i prikladnoy psikhologii. SPb.: Piter, 2000. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ганопольский Вячеслав Павлович — д. м. н., начальник НИО, Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Матыцин Вячеслав Олегович — к. м. н., старший научный сотрудник НИЛ (физиологии военного труда) НИО (обитаемости) НИЦ, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Гринчук Светлана Сергеевна — Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Ятманов Алексей Николаевич — к. м. н., Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Лопатина Вера Федоровна — к. б. н., Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Заплутанов Василий Андреевич — ФГБУН РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), Санкт-Петербург

Одномоментное многоцентровое исследование использования антимикробных препаратов в российских стационарах: результаты проекта GLOBAL-PPS 2017

*С. А. РАЧИНА¹, Ю. А. БЕЛЬКОВА², Р. С. КОЗЛОВ², А. С. АНИКЕЕВ¹, А. В. ТОЛПЫГО², Е. Г. БУРАСОВА³, Л. Г. ЕЖОВА^{1,4}, Е. В. ЕЛОХИНА^{5,6}, В. М. МИЩЕНКО⁷, О. Г. НИ⁸, Г. А. ПЕНЖОЯН⁸, Е. Е. СВЕНТИЦКАЯ³, Ю. А. СТРЕЖ⁹, В. Д. ШЕГИМОВА³

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² Смоленский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Смоленск

³ Республиканская клиническая больница им. Н. А. Семашко, Улан-Удэ

⁴ Городская клиническая больница им. В. В. Виноградова, Москва

⁵ Областная клиническая больница, Омск

⁶ Омский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Омск

⁷ Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования, Смоленск

⁸ Краевая клиническая больница № 2, Краснодар

⁹ Томская областная клиническая больница, Томск

Point Prevalence Multicenter Survey of Antimicrobial Utilization in Russian Hospitals: the Results of GLOBAL-PPS 2017

*S. A. RACHINA¹, YU. A. BELKOVA², R. S. KOZLOV², A. S. ANIKEEV¹, A. V. TOLPYGO², E. G. BURASOVA³, L. G. EZHOVA^{1,4}, E. V. ELOKHINA^{5,6}, V. M. MISHCHENKO⁷, O. G. NI⁸, G. A. PENZHOIAN⁸, E. E. SVENTITSKAIA³, YU. A. STREZH⁹, B. D. SHEGIMOVA³

¹ RUDN University, Moscow

² Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Smolensk

³ Republican clinical hospital. N. A. Semashko, Ulan-Ude

⁴ City clinical hospital. V. V. Vinogradova, Moscow

⁵ Omsk Regional Clinical Hospital, Omsk

⁶ Omsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Omsk

⁷ Federal Center of Traumatology, Orthopaedics and Endoprosthesis, Smolensk

⁸ Regional Clinical Hospital No. 2, Krasnodar

⁹ Tomsk Regional Clinical Hospital, Tomsk

Представлены результаты российского сегмента одномоментного исследования применения антимикробных препаратов (АМП) «The Global Point Prevalence Survey of Antimicrobial Consumption and Resistance» (GLOBAL-PPS), собранные в 7 многопрофильных стационарах различных городов Российской Федерации (Краснодар, Москва, Омск, Смоленск, Томск, Улан-Удэ) за период с сентября по ноябрь 2017 г. Объектом исследования были медицинские карты пациентов, получавших с профилактической или лечебной целью системные АМП. В рамках исследования проводилось изучение практики использования указанных препаратов, а также оценка соответствия назначений индикаторам качества, заданным протоколом международного исследования GLOBAL-PPS. Выявлены основные погрешности, нуждающиеся в первоочередной коррекции: недостаточно высокая частота следования рекомендациям, отсутствие в медицинской документации сроков смены/отмены препаратов, нецелесообразно длительная периоперационная антибиотикопрофилактика, неоправданно частое назначение цефалоспоринов III поколения, низкая частота этиотропной терапии. Полученные данные могут стать основой для разработки мер по оптимизации антимикробной терапии в каждом из стационаров, участвовавших в проекте.

Ключевые слова: антимикробные препараты, фармакоэпидемиология, одномоментное исследование.

The results of Global Point Prevalence Survey of Antimicrobial Consumption and Resistance (GLOBAL-PPS) project conducted in 7 multi-field hospitals in different cities of Russia (Krasnodar, Moscow, Omsk, Smolensk, Tomsk, Ulan-Ude) during the period from September to November 2017 are presented. Case records of patients who received systemic antimicrobial agents for the treatment or prevention of infections were analyzed. Local practices of antimicrobials administration were evaluated with help of quality indicators defined in GLOBAL-PPS study protocol. Common mistakes requiring a prompt intervention included low adherence to clinical guidelines, absence of stop/review dates in the medical records, extended duration of surgical prophylaxis, III generation cephalosporin's overuse for prophylaxis and treatment and low frequency of therapy based on microbiological data. Our data provide the basis for the development of appropriate antimicrobial stewardship programs tailored according to local practices for each multi-field hospital in the project.

Keywords: antimicrobials, pharmacoepidemiology, point prevalence survey.

© Коллектив авторов, 2019

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

Введение

Антимикробная резистентность является одним из основных факторов, ограничивающих успешное лечение инфекционных заболеваний, что сопровождается неблагоприятными медицинскими, социальными и экономическим последствиями в мировом масштабе [1, 2]. Возникновение резистентности связывают с селективным давлением, оказываемым антимикробными препаратами (АМП) на популяцию микроорганизмов [3]. Одной из ведущих причин роста устойчивости к АМП в условиях лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) является нерациональное использование, на долю которого приходится до 50% всех назначений препаратов указанной группы [4].

Регулярный мониторинг практики применения АМП с оценкой качества предоставляет ключевую информацию, необходимую для направленной оптимизации фармакотерапии [5], однако использование с этой целью классических фармакоэпидемиологических исследований является трудоёмким, время и ресурсозатратным процессом, малоприменимым в рутинной клинической практике. Упомянутые сложности, а также низкий уровень компьютеризации и оснащения электронными базами регистрации информации о пациентах и движении лекарственных средств служат основными причинами отсутствия в ЛПУ Российской Федерации единой системы сбора данных о практике использования АМП. В то же время, доступные результаты фармакоэпидемиологических исследований свидетельствуют об относительно высокой частоте и нерациональных подходах к применению указанных препаратов [6–8].

Одномоментные исследования зарекомендовали себя как удобный и малозатратный, но при этом стандартизированный и валидированный инструмент мониторинга практики применения лекарственных средств в условиях стационара [9]. Одним из проектов на основе данной методологии является исследование практики применения АМП «The Global Point Prevalence Survey of Antimicrobial Consumption and Resistance» (GLOBAL-PPS), включавшее на момент выполнения публикуемой работы 391 лечебное учреждение из 51 страны мира [10]. В текущей статье представлены результаты российского сегмента проекта.

Проект ставит целью разработку и внедрение универсального метода сбора данных о практике назначения АМП у госпитализированных больных в разных странах мира с динамической оценкой качества их применения.

Материал и методы

За период с сентября по ноябрь 2017 г. проводился сбор данных о практике назначения АМП в ЛПУ следующих горо-

дов РФ: Краснодар, Москва, Омск, Смоленск (2 центра), Томск, Улан-Удэ. С целью соблюдения конфиденциальности в данной публикации стационарам были присвоены номера от 1 до 7 (далее центры 1–7), при этом ЛПУ со взрослым контингентом пациентов получили номера 1–2; стационары со смешанным контингентом, но без неонатальных отделений — 3–4; ЛПУ, включающее отделения только взрослого и неонатального профиля — 5; стационары с отделениями взрослого, детского и неонатального профиля — 6–7.

Исследование охватывало все отделения каждого стационара, при этом сбор данных в одном отделении проводился в течение одного дня, а во всем ЛПУ не превышал четырёх недель. Объектом исследования являлись медицинские карты пациентов, получавших с профилактической или лечебной целью следующие системные АМП: все антибактериальные препараты; противогрибковые, противотуберкулёзные и противомаларийные препараты; антибиотики, используемые для лечения инфекций ЖКТ; производные нитроимидазола; противовирусные препараты для лечения гриппа — ингибиторы нейраминидазы.

В рамках работы изучалась практика назначения АМП, а также проводилась оценка соответствия антимикробной терапии (АМТ) индикаторам качества, заданным протоколом международного исследования GLOBAL-PPS:

1. соответствие выбора АМП национальным и/или локальным рекомендациям;
2. документирование показаний к назначению АМП и даты его отмены/смены;
3. назначение АМП на основании биомаркеров (С-реактивный белок, прокальцитонин);
4. назначение АМП на основании данных бактериологического исследования (частота этиотропной терапии).

Подробная информация о методологии исследования и результатах его международной части представлена на сайте проекта: www.global-pps.com.

Анализ данных российского сегмента проекта проводился сотрудниками Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАК-МАХ) в программе MS Office Excel 2010 для Windows 7 с использованием методов описательной статистики. Количественные признаки описывались в виде минимального, максимального, среднего значений; качественные признаки представлялись в виде долей (%) и абсолютных чисел.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования была собрана информация о применении АМП в 7 многопрофильных стационарах. Основные характеристики ЛПУ и контингента пациентов, включенных в исследование, представлены в табл. 1.

Общая популяция пациентов каждого из ЛПУ в дни сбора данных составила от 163 до 1002 человек, что обусловлено различным размером стационаров и количеством в них отделений. При этом доля пациентов, получавших АМП, в ЛПУ значительно различалась как в целом (от 17,8% — в центре 4 до 32,6% — в центре 1), так и в пределах разделения по возрастному контингенту: от 19,4 до 32,6% — во взрослых отделениях всех ЛПУ, от 10 до 33,3% — в педиатрических отделениях и от 14,3% до 54,8% — в неонатальных отделениях.

Несмотря на значительную вариабельность показателей, можно выделить общие тенденции в частоте назначения АМП в зависимости от профиля отделений в ЛПУ (табл. 2). Так, в терапевти-

Таблица 1. Характеристики ЛПУ и пациентов, включённых в исследование

Характеристики ЛПУ	Центры						
	1	2	3	4	5	6	7
Количество отделений в ЛПУ	14	24	29	6	28	27	32
Количество педиатрических/неонатальных отделений	0/0	0/0	2/0	2/0	0/3	1/2	7/1
Общая популяция пациентов в дни сбора данных, <i>n</i>	663	902	786	163	945	1002	977
Доля пациентов, получавших системные АМП, <i>n</i> /%	216/32,6	175/19,4	152/19,4	30/18,3	186/19,7	270/26,9	191/19,5

Таблица 2. Частота назначения системных АМП в отделениях разного профиля, %

Профиль отделений	Центры						
	1	2	3	4	5	6	7
Терапевтические							
Взрослые	22,5	18,9	9,6	—	8,2	23,6	9,0
Детские	—	—	—	—	—	6,2	—
Новорождённые	—	—	—	—	35,9	—	—
Хирургические							
Взрослые	40,9	16,6	26,4	18,3	22,4	28,7	26,9
Детские	—	—	24,1	10,0	—	50,0	25,6
ОРИТ							
Взрослые	46,4	53,3	40,6	—	82,9	100	47,1
Детские	—	—	—	—	—	—	40,0
Новорождённые	—	—	—	—	76,5	14,3	100*

Примечание. * — 100% показатель обусловлен наличием в отделении одного пациента, в связи с чем не учитывался при анализе данных.

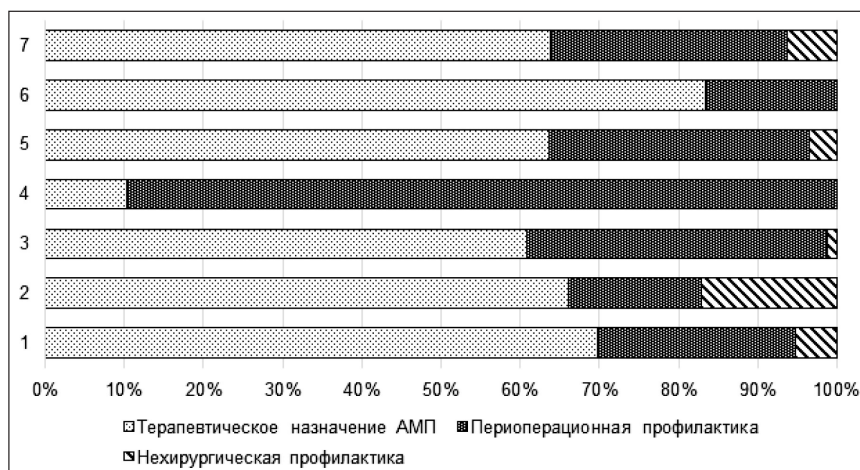


Рис. 1. Структура показаний к назначению системных АМП в исследуемых центрах.

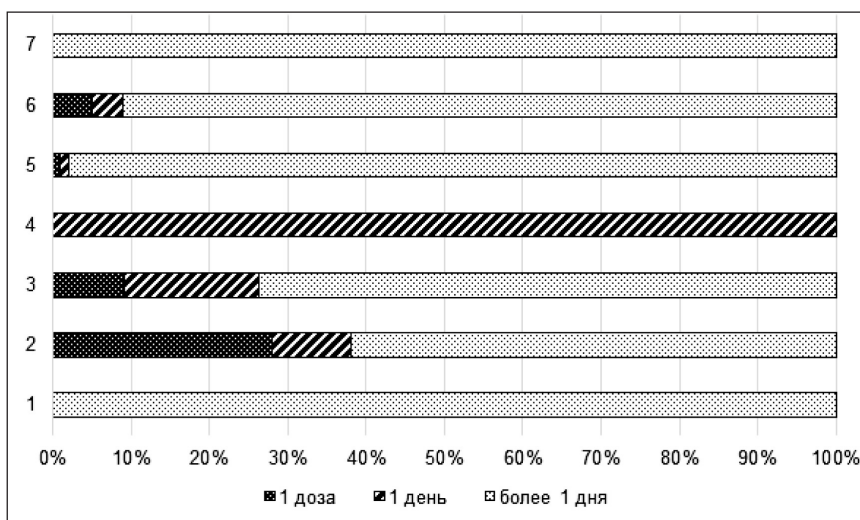


Рис. 2. Длительность проведения хирургической профилактики в исследуемых центрах.

ческих отделениях данный показатель был наиболее низким: от 6,2 до 35,9% (8,2—23,6% во взрослых отделениях, 6,2% — в единственном детском и 35,9% — в отделении для новорождённых), в хирургических отделениях более высоким: 10—50% (16,6—40,9% — во взрослых и 10—50% — в детских отделениях), тогда как в условиях ОРИТ доля пациентов, получавших АМП, была максимальной, достигая 100% (40,6—100% — во взрослых отделениях, 40% — в детских и 14,3—76,5% — в отделениях для новорождённых).

Структура показаний к назначению системных АМП в исследуемых центрах представлена на рис. 1, длительность проведения хирургической профилактики на рис. 2. Терапевтическое применение системных АМП превалировало во всех ЛПУ (от 60,9% — в центре 3 до 83,4% — в центре 6), кроме центра 4, где на долю данного типа назначений приходилось только 10,3%. Периоперационная антибиотикопрофилактика была наиболее широко представлена в центре 4 (89,7%), в других стационарах её доля варьировала от 16,7 до 37,9%; нехирургическая профилактика

Таблица 3. Структура классов системных АМП, назначавшихся пациентам в ЛПУ в дни проведения исследования, %

АМП	Центры						
	1	2	3	4	5	6	7
Пенициллины	15,2	16,3	18,1	—	20,8	13	9,3
Цефалоспорины I поколения	11,2	13,4	19,9	89,7	1,6	0,3	8,4
Цефалоспорины II поколения	—	—	—	—	—	1,8	—
Цефалоспорины III поколения	27,3	20	39,2	—	23,6	42,6	56,7
Цефалоспорины IV поколения	0,4	—	1,2	—	—	—	1
Карбапенемы	2,2	7,9	5,4	—	16,4	2,4	2,8
Хинолоны	16,5	11,2	6	—	19,2	27,5	7
Аминогликозиды	3,2	7,9	2,4	—	6	1,5	4,7
Макролиды, линкозамиды и стрептограммины	1,4	3,7	5,4	—	1,2	1,2	6,5
Сульфаниламиды и триметоприм	—	12,6	—	—	—	—	—
Тетрациклины	—	1,4	—	—	1,2	—	—
Другие АМП	22,7	5,6	2,4	10,3	10	9,7	3,7

Таблица 4. Структура АМП, наиболее часто назначавшихся в центрах по основным показаниям в рамках антимикробной терапии, %

Показания	Центры							Средняя	АМП
	1	2	3	4	5	6	7		
Пневмония	4	15	20	—	34	17	15	15	Цефоперазон
	22	16	—	—	16	17	6	11	Левифлоксацин
	10	7	—	—	8	36	15	11	Цефтриаксон
	4	—	40	—	—	—	12	8	Амоксициллин/клавуланат
	24	25	—	—	—	—	—	7	Ампициллин/сульбактам
	7	8	7	—	—	17	—	6	Ципрофлоксацин
	—	—	—	—	34	—	—	5	Имипенем
	10	—	13	—	8	—	—	4	Амикацин
	10	—	—	—	—	—	19	4	Цефотаксим
	—	10	—	—	—	—	—	5	Меропенем
	—	—	13	—	—	—	—	2	Эртапенем
	—	—	—	—	—	12	—	2	Моксифлоксацин
	—	—	—	—	—	—	9	1	Азитромицин
	—	—	7	—	—	—	—	1	Цефепим
Сепсис	50*	—	—	—	—	—	50*	—	Меропенем
	50*	—	—	—	—	—	—	—	Ванкомицин
	—	—	—	—	—	—	50*	—	Имипенем

Примечание. * — в связи с малым объемом наблюдений данные не подлежат статистическому анализу и приведены исключительно для ознакомления.

не проводилась в дни исследования в центрах 4 и 6, тогда как в других стационарах её доля составила 1,2—17,2%.

Частота назначения препаратов группы пенициллина в стационарах, включённых в проект, варьировала в пределах 10—20% за исключением центра 4, в котором указанные препараты не применялись совсем (табл. 3). Доля карбапенемов в общей структуре назначений не превышала 10%, за исключением центра 5 (16,4%). Хинолоновые АМП назначались с частотой 6—27,5%, за исключением центра 4. Примечательно, что сульфаниламиды и триметоприм назначались только в центре 2 (12,6%). Тетрациклины использовались исключительно в центрах 2 и 5 и составляли незначительную часть в структуре назначений (1,4 и 1,2%, соответственно). По преобладанию «других АМП», а именно фуразидина, метронидазола, ванкомицина, линезолида, нитроксолина, колистина, в структуре назначений лидировал центр 1 (22,7%).

Структура АМП, наиболее часто назначавшихся в центрах по основным показаниям в рамках антимикробной терапии, хирургической и нехирургической антимикробной профилактики, представлена в табл. 4—6.

Наиболее распространёнными АМП в лечении пневмонии оказались цефоперазон, который назначался во всех стационарах, кроме центра 4, с частотой 4—34%, левофлоксацин и цефтриаксон, назначавшиеся в 5 стационарах из 7, с частотой 6—22% и 8—36%, соответственно. Существенной была также суммарная доля ингибиторозащищённых пенициллинов (амокксициллин/клавуланат с частотой 4—40% и ампициллин/сульбактам с частотой 24—25%). Приведённая структура препаратов предполагает использование в терапии как нозокомиальной, так и внебольничной пневмонии. К сожалению, методология проекта не позволяет разделить указанные нозологии и, следовательно, оценить рациональность терапии. В связи с малой выборкой структура препаратов, использованных в терапии пациентов с сепсисом, не подлежит анализу и приведена исключительно для ознакомления (см. табл. 4).

Для проведения общей нехирургической профилактики наиболее широко применялся цефтриаксон, назначавшийся в 5 из 7 центров с частотой 5—40%, тогда как другие препараты назначались лишь в 1—2 центрах. Примечательной является высокая частота использования ко-тримоксазола в

Таблица 5. Структура АМП, наиболее часто назначавшихся в центрах по основным показаниям в рамках нехирургической антимикробной профилактики, %

Показания	Центры							Средняя	АМП
	1	2	3	4	5	6	7		
Общая профилактика	—	62	—	—	—	—	—	62	Ко-тримоксазол
	47	—	—	—	—	—	—	47	Фуразидин
	38	—	—	—	—	—	—	38	Ампициллин/сульбактам
	15	5	50*	—	40	—	36	24	Цефтриаксон
	—	—	—	—	—	—	22	22	Цефотаксим
	—	—	—	—	20	—	—	20	Метронидазол
	—	17	—	—	—	—	—	17	Кетоконазол
	—	—	50*	—	—	—	15	15	Амоксициллин/клавуланат
	—	—	—	—	—	—	15	15	Цефазолин
	—	5	—	—	20	—	—	13	Амикацин
	—	3	—	—	20	—	—	12	Ципрофлоксацин
	8	—	—	—	—	—	—	8	Цефоперазон/сульбактам
	8	—	—	—	—	—	—	8	Ампициллин
	—	8	—	—	—	—	6	7	Флуконазол
	—	—	—	—	—	—	6	6	Цефоперазон
Профилактика респираторных инфекций	50	—	—	—	—	—	—	50	Ампициллин/сульбактам
	—	—	—	—	—	—	40	40	Цефазолин
	25	—	—	—	—	—	—	25	Ампициллин
	25	—	100*	—	—	—	20	23	Цефтриаксон
	—	—	—	—	—	—	20	20	Амоксициллин/клавуланат
Профилактика в урологии	—	—	—	—	—	—	20	20	Цефотаксим
	100*	—	—	—	—	—	—	—	Фуразидин
	—	—	—	—	100*	—	—	—	Амикацин
	—	—	—	—	—	—	65*	—	Цефтриаксон
Профилактика заболеваний ЖКТ	—	—	—	—	—	—	35*	—	Флуконазол
	100*	—	—	—	—	—	—	—	Цефтриаксон
	—	—	—	—	50*	—	—	—	Метронидазол
	—	—	—	—	50*	—	—	—	Ципрофлоксацин

Примечание. Здесь и в табл. 6: * — в связи с малым объёмом наблюдений данные не подлежат статистическому анализу и приведены исключительно для ознакомления.

центре 2 (62%) и фуразидина в центре 1 (47%). Для нехирургической профилактики респираторных инфекций применялись исключительно бета-лактамы АМП, однако малое количество наблюдений не позволяет проанализировать структуру препаратов в полной мере. Не подлежат анализу и данные нехирургической профилактики урологических заболеваний и заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (см. табл. 5).

В общей периоперационной антибиотикопрофилактике преобладали цефазолин (использовался во всех ЛПУ с частотой 2—100%) и цефтриаксон (6 из 7 ЛПУ, частота 13—62%). Значимая доля назначений приходилась на ципрофлоксацин (5 из 7 центров, частота 4—31%), ингибиторозащищённые пенициллины (ампициллин/сульбактам — 2 из 7 центров, 33%, и амоксициллин/клавуланат — 4 из 7 центров, 3—18%) и метронидазол (5 из 7 центров, 2—14%).

Для антибиотикопрофилактики при операциях на лёгких применялись ингибиторозащищённые пенициллины, преимущественно амоксициллин/клавуланат, что согласуется с рекомендациями, а также цефалоспорины III поколения и левофлоксацин, что представляется нерациональным. Периоперационная антибиотикопрофилактика у урологических пациентов наиболее широко проводилась цефтриаксоном (4 центра,

средняя частота 55%, причём в центрах 3 и 7 данный препарат использовался у 100% пациентов), что является нерациональным. Из других опций лидировали фуразидин, ампициллин/сульбактам и фторхинолоны. Для профилактики при операциях на органах ЖКТ применялись ингибиторозащищённые пенициллины, цефазолин, метронидазол и фторхинолоны, что отвечает современным подходам, а также цефтриаксон (в среднем 43%), цефоперазон (в среднем 13%) и эртапенем (6% — в центре 5), что представляется нерациональным (см. табл. 6).

Необходимо подчеркнуть, что данные о применении АМП как с терапевтическими, так и с профилактическими целями, при указанных нозологиях в большинстве случаев получены в отдельных центрах и не подлежат экстраполяции на все стационары, участвующие в проекте.

Анализ практики назначения АМП в исследовательских центрах подтвердил преобладающую долю внутривенной терапии в условиях стационара (от 76,8% — в центре 5 до 100% — в центре 4); частота комбинированной терапии варьировала от 0% — в центре 4 до 26,9% — в центре 1 (табл. 7). В абсолютном большинстве случаев (84,9—96,8%) назначение АМП проводилось эмпирически. При этом в большинстве центров выбор препарата соответствовал национальным и/или локаль-

Таблица 6. Структура АМП, наиболее часто назначавшихся в центрах по основным показаниям в рамках периперационной антибиотикопрофилактики, %

Показания	Центры							Средняя	АМП
	1	2	3	4	5	6	7		
Общая профилактика	30	22	42	100	7	2	8	30	Цефазолин
	20	17	44	—	13	48	62	29	Цефтриаксон
	15	3	—	—	31	16	4	10	Ципрофлоксацин
	—	33	—	—	33	—	—	9	Ампициллин/сульбактам
	3	—	9	—	—	18	6	5	Амоксициллин/клавуланат
	14	3	—	—	7	6	2	5	Метронидазол
	—	12	4	—	—	—	8	3	Цефотаксим
	15	—	—	—	—	—	—	2	Фуразидин
	—	—	—	—	—	—	13	2	Линкомицин
	—	—	—	—	—	10	—	1	Цефуроксим
	—	—	—	—	7	—	—	1	Амикацин
	—	6	—	—	—	—	—	1	Левифлоксацин
Профилактика при операциях на лёгких	—	—	2	—	—	—	—	0,3	Гентамицин
	—	—	50	—	—	—	—	50	Амоксициллин/клавуланат
	—	32	50	—	—	—	100*	41	Цефтриаксон
	—	32	—	—	—	—	—	32	Левифлоксацин
	—	18	—	—	—	—	—	18	Цефотаксим
Профилактика в урологии	—	18	—	—	—	—	—	18	Ампициллин/сульбактам
	65	—	—	—	—	—	—	65	Фуразидин
	7	—	100	—	13	—	100	55	Цефтриаксон
	—	—	—	—	32	—	—	32	Ампициллин/сульбактам
	14	36*	—	—	34	—	—	24	Ципрофлоксацин
	14	—	—	—	—	—	—	14	Левифлоксацин
	—	—	—	—	13	—	—	13	Амикацин
	—	—	—	—	8	—	—	8	Амоксициллин
Профилактика при операциях на органах ЖКТ	—	64*	—	—	—	—	—	—	Цефотаксим
	—	—	—	—	58	—	—	58	Ампициллин/сульбактам
	65	—	—	—	6	63	37	43	Цефтриаксон
	—	100*	—	—	—	—	25	25	Цефазолин
	22	—	—	—	6	24	7	15	Метронидазол
	13	—	—	—	—	13	—	13	Ципрофлоксацин
	—	—	—	—	18	—	7	13	Цефоперазон
	—	—	—	—	—	—	12	12	Амоксициллин/клавуланат
	—	—	—	—	—	—	12	12	Цефотаксим
	—	—	—	—	6	—	—	6	Эртапенем
	—	—	—	—	6	—	—	6	Амикацин

Таблица 7. Локальная практика назначения АМП в исследовательских центрах и её соответствие индикаторам качества, доля пациентов в %

Практика назначения АМП	Центры						
	1	2	3	4	5	6	7
Комбинированная АМТ	26,9	22,8	7,2	0	14	20,2	8,7
Внутривенная терапия	87,5	87,7	90,2	100	78,9	76,8	87,8
Этиотропная АМТ	3,2	9,8	15,1	6,9	14,4	4,8	3,2
АМТ, соответствующая рекомендациям	53,2	69,1	44,5	100	63,2	91,1	52,5
АМТ, обоснованная показаниями в медицинской документации	86,9	79,4	92,9	100	77,3	97,9	63,4
Наличие в документации даты отмены/смены АМП	7	36,5	15,4	100	64,5	98,5	23,5

ным рекомендациям, лишь в центре 3 данный показатель составлял 44,5%. Наличие в медицинской документации пациентов записей, обосновывающих назначение АМП, варьировало от 63,4% (центр 7) до 100% (центр 5), тогда как отмена и/или смена препаратов документировалась значительно реже (7—64,5%, кроме центра 5, где данный показатель достигал 100%).

Обсуждение результатов

АМП представляют уникальный класс лекарственных средств. Их внедрение в клиническую практику радикально изменило подходы к оказа-

нию медицинской помощи, структуру заболеваемости и летальности [11]. Активность АБП является ценным, но ограниченным ресурсом. В последние годы в стационарах нашей страны отмечается устойчивый рост распространённости полирезистентных микроорганизмов, в первую очередь энтеробактерий, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия, устойчивых к карбапенемам штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* и метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* [12—15]. Так, уже к 2012 г. каждая 8-я нозокомиальная инфекция в российских стационарах была вызвана

экстремально резистентными грамотрицательными бактериями [16].

По данным многоцентрового российского исследования МАРАФОН, охватывающего 35 стационаров 22 городов РФ, доля продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра среди нозокомиальных штаммов энтеробактерий к 2013–2014 гг. составила более 75% в сочетании с высокими уровнями устойчивости к традиционно используемым в терапии вызванных ими инфекций небета-лактамами АМП, такими как аминогликозиды (49,7–65,5%) и фторхинолоны (65,4%). Несмотря на то, что карбапенемы сохраняют активность в отношении большинства (82–92%) нозокомиальных штаммов энтеробактерий, тревожной тенденцией является увеличение доли изолятов, резистентных к препаратам данной группы, в том числе, в силу продукции карбапенемаз (7,8%) [12]. Рост устойчивости к карбапенемам был отмечен и у нозокомиальных изолятов *P.aeruginosa* (65,7% — для имипенема и 59,7% — для меропенема) и *A.baumannii* (70,9 и 74,7%, соответственно). При этом фенотипом множественной устойчивости к АМП обладали 83,2% изолятов *P.aeruginosa* и 98% изолятов *A.baumannii*, фенотипом экстремальной резистентности — 51,4 и 64,4% изолятов, соответственно [13, 14].

Столь выраженный рост устойчивости микроорганизмов к антибиотикам на фоне отсутствия перспектив появления в ближайшем будущем принципиально новых препаратов подчёркивает настоятельную необходимость переоценки практики использования данных препаратов, а также её влияния на эпидемическую ситуацию в ЛПУ. Одним из главных барьеров на пути целенаправленной разработки и успешного внедрения в российских стационарах программ по рационализации антимикробной терапии является недостаток информации о количественных и качественных аспектах использования АМП. Для повышения осведомленности при разработке подобных программ, а также оценки их эффективности необходим регулярный мониторинг практики применения указанных препаратов, и одномоментные исследования, такие как GLOBAL-PPS предоставляют такую возможность [17].

Протокол международного исследования GLOBAL-PPS был разработан на основе опыта трёх одномоментных исследований, выполненных Европейским проектом по надзору за антимикробными препаратами (ESAC) в период с 2006 по 2009 гг. Серия исследований ESAC стартовала с 20 ЛПУ из 20 стран Европейского союза и к моменту завершения проекта включала 200 ЛПУ из 25 стран [9, 18]. В исследование GLOBAL-PPS, начавшееся в 2014 г., вошли данные 335 ЛПУ из 53 стран мира, к 2017 г. количество стационаров-участников достигло 391 [10]. Проект был спланирован как универсальный

инструмент, позволяющий не только получить информацию о применении АМП у госпитализированных пациентов, но и определить круг проблем на уровне каждого ЛПУ с целью разработки адресных мер по улучшению практики применения данного класса лекарственных средств, а также контроля эффективности их внедрения [19].

Хотя GLOBAL-PPS является не первым одномоментным исследованием использования АМП в нашей стране, его актуальность очевидна. Выполненный в 2015 г. сегмент проекта выявил распространённые ошибки, нуждающиеся в первоочередной коррекции, такие как неоправданно длительная периоперационная антибиотикопрофилактика, широкое использование цефалоспоринов III поколения с лечебными и профилактическими целями, отсутствие обоснования назначения АМТ и сроков её смены/отмены в медицинской документации, недостаточно высокая частота следования рекомендациям и назначения этиотропной терапии [8], что оказалось актуальным и по результатам текущего исследования.

При этом необходимо подчеркнуть, что, хотя данное исследование является продолжением проекта GLOBAL-PPS-2015, практически полностью сменившийся состав центров-участников не позволяет проводить сравнение результатов в динамике. С другой стороны, однотипный характер выявленных проблем свидетельствует об их широкой распространённости и подчёркивает важность внедрения не только в стационарах участвующих в проекте, но и в других российских стационарах мер по оптимизации применения АМП.

Чертой, отличающей GLOBAL-PPS-2017 от исследования, выполненного в 2015 г., является более гетерогенный состав исследовательских центров, по возрастному составу, специализации стационаров (от многопрофильных стационаров до федерального центра, оказывающего высокотехнологичную медицинскую помощь при узком перечне нозологий) и их коечному фонду, что стало причиной существенных вариаций большинства показателей. Тем не менее, ряд закономерностей обращает на себя внимание.

Так, результаты текущего исследования свидетельствуют о достаточно высокой частоте применения системных АМП в многопрофильных стационарах, вне зависимости от возрастного контингента пациентов. Хотя наиболее высокие уровни потребления были присущи отделениям реанимации и интенсивной терапии (в ряде центров до 100%), в некоторых центрах доля пациентов, получавших АМП в день исследования, была относительно высокой и в отделениях хирургического (до 41–50%), и терапевтического (до 36%) профилей.

Основная масса АМП в центрах участниках назначалась с терапевтическими целями. В то же время в ряде стационаров была зафиксирована

относительно высокая частота использования препаратов в рамках нехирургической профилактики, что, с учётом небольшого перечня показаний, требует более детального изучения для оценки рациональности подобных назначений и может стать одной из потенциальных точек предложения усилий по коррекции избыточного использования препаратов данной группы.

Высокая частота назначения препаратов группы бета-лактамов в российских стационарах нашла подтверждение и в рамках текущего проекта. Лидирующая позиция цефалоспоринов III (цефтриаксон, цефотаксим), доля которых в отдельных стационарах достигала 40–50% от всех назначений АМП, требует коррекции, так как широкое применение препаратов данной группы сопровождается доказанными рисками возникновения *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи и селекции резистентности, особенно у грамотрицательных микроорганизмов [20]. Достоверно показано влияние применения цефалоспоринов на вероятность развития инфекций, вызванных штаммами энтеробактерий, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (отношение шансов 6 — для *Escherichia coli* и 3,9 — для *Klebsiella pneumoniae*) [21, 22] и MRSA (относительный риск 2,2) [23], а также на распространение в стационаре ванкомицинорезистентных энтерококков [24].

Анализ практики использования АМП при отдельных нозологиях позволил составить представление о средствах, наиболее широко назначавшихся с указанными целями. Так, анализ структуры препаратов для проведения периоперационной антибиотикопрофилактики свидетельствует о применении цефтриаксона по указанному показанию во всех стационарах участников проекта, кроме центра 4, с частотой, достигающей в отдельных центрах 100%. Достоверно известно, что использование цефалоспоринов III поколения в рамках периоперационной антибиотикопрофилактики не рекомендуется в связи с отсутствием значимых преимуществ перед цефалоспориновыми I–II поколения по эффективности и высоким риском селекции резистентности [25]. Тот факт, что во многих центрах цефалоспорины III поколения назначались с профилактическими целями, предоставляет возможности по снижению нерационального использования средств данного класса в рамках локальных стратегий оптимизации применения системных АМП в центрах-участниках проекта.

Ещё одним потенциальным способом повышения рациональности использования АМП в условиях стационаров является сокращение длительности периоперационной антибиотикопрофилактики до рекомендованных однократных введений (с дополнением повторной дозой при длительном оперативном вмешательстве), по-

скольку выявленная в ходе проекта тенденция к пролонгации назначения АМП с указанными целями до суток и более не приводит к повышению успеха профилактики и зарекомендовала себя как нерациональная [25].

Одним из преимуществ проекта GLOBAL-PPS является стандартизированная система индикаторов качества, позволяющая оценить ключевые аспекты назначения АМП. В частности, выявленная в центре 3 недостаточно высокая частота следования рекомендациям (44,5%) может стать одной из основных задач программы оптимизации применения АМП в данном стационаре. При разработке указанной программы в большинстве исследовательских центров, включая центры 1, 2, 3, 5 и 7, целесообразно также учесть документирование сроков отмены/смены АМП, а в центре 7 также обоснование назначения АМП. Включение данной информации в медицинскую документацию позволит снизить долю необоснованных назначений и обеспечит рациональный подход к использованию указанных препаратов. Повышение доли этиотропной терапии также может быть полезным инструментом оптимизации во всех исследовательских центрах.

Необходимо упомянуть об ограничениях, присущих проведённому исследованию и напрямую проистекающих из его методологии. Полученные в ходе проекта данные являются обобщёнными и/или средними показателями. В проекте не учитываются популяционные и индивидуальные характеристики пациентов, длительность и исходы терапии, структура заболеваемости и локальная эпидемиологическая ситуация в ЛПУ, коечный фонд, административные и организационные особенности учреждения, региональные особенности и другие факторы, оказывающие влияние на назначение АМП. Все вышеперечисленное требует осторожного подхода при интерпретации результатов исследования и проведении сравнений между стационарами, а не в динамике в рамках одного ЛПУ.

С другой стороны, преимущества одномоментных исследований, такие как простота и унификация подходов к сбору данных, использование он-лайн базы для их консолидации и валидации, а также представление центрам отчётов, которые могут быть использованы для повышения осведомленности специалистов о ситуации в ЛПУ и как основа для разработки стратегий оптимизации применения указанных препаратов в центрах-участниках, а при продолжительном участии в проекте и для оценки динамики и контроля эффективности указанных вмешательств, позволяют считать их важным инструментом оценки практики применения АМП в условиях стационара.

Заключение

Нерациональный подход к назначению АМП причиняет существенный ущерб здоровью пациентов и обладает выраженным отрицательным социальным и экономическим эффектом. Стабильный рост устойчивости микроорганизмов к АМП в российских стационарах обуславливает настоятельную необходимость внедрения программ по рациональному использованию указанной группы лекарственных средств у госпитализированных пациентов, что невозможно без регулярного мониторинга количественных и качественных аспектов применения.

Исследование GLOBAL-PPS-2017, результаты российского сегмента которого приведены в

текущей публикации, выявило наиболее значимые погрешности в назначении АМП в условиях стационара, такие как: недостаточно высокая частота следования рекомендациям, отсутствие в медицинской документации сроков смены/отмены препаратов, нецелесообразно длительная периоперационная антибиотикопрофилактика, неоправданно частое назначение цефалоспоринов III поколения, низкая частота этиотропной терапии. Полученные данные могут стать основой для совершенствования подходов к применению АМП с учётом локальных особенностей и потребностей каждого стационара, а повторное участие в проекте — использоваться для контроля эффективности корректирующих вмешательств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maragakis L.L., Perencevich E.N., Cosgrove S.E. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6 (5): 751–763.
2. Cosgrove S.E. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis* 2006; 42: Suppl 2: 82–89.
3. Livermore D.M. The zeitgeist of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: Suppl 1: 59–61.
4. Lieberman J.M. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 1143–1151.
5. Heritage J., Elliott M.N., Stivers T. et al. Reducing inappropriate antibiotics prescribing: the role of online commentary on physical examination findings. *Patient Education and Counseling* 2010; 81: 119–125.
6. Белькова Ю.А., Рачина С.А., Козлов Р.С. и др. Потребление и затраты на системные антимикробные препараты в многопрофильных стационарах Российской Федерации и Республики Беларусь: результаты многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. — 2012. — Т. 14. — № 4. — С. 322–341. / Bel'kova Jy.A., Rachina S.A., Kozlov R.S. i dr. Potrebienie i zraty na sistemnye antimikrobnye preparaty v mnogoprofil'nykh stacionarakh Rossijskoj Federacii i Respubliki Belarus': rezul'taty mnogocentrovogo farmakoepidemiologicheskogo issledovaniya. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2012; 14: 4: 322–341. [in Russian]
7. Белькова Ю.А., Рачина С.А., Козлов Р.С. и др. Потребление и затраты на системные антимикробные препараты в отделениях хирургического профиля многопрофильных стационаров Российской Федерации и Республики Беларусь: результаты многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования. *Антибиотики и химиотер.* — 2016. — Т. 61. — № 1–2. — С. 15–31. / Bel'kova Jy.A., Rachina S.A., Kozlov R.S. i dr. Potrebienie i zraty na sistemnye antimikrobnye preparaty v otdeleniyakh khirurgicheskogo profilya mnogoprofil'nykh stacionarov Rossijskoj Federacii i Respubliki Belarus': rezul'taty mnogocentrovogo farmakoepidemiologicheskogo issledovaniya. *Antibiotiki i khimioter* 2016; 61: 1–2: 15–31. [in Russian]
8. Рачина С.А., Захаренков И.А., Белькова Ю.А. и др. Одномоментное исследование использования антимикробных препаратов в многопрофильных стационарах Российской Федерации. *Клиническая фармакология и терапия*. — 2017. — Т. 26. — № 2. — С. 62–69. / Rachina S.A., Zakharenkov I.A., Bel'kova Ju.A. i dr. Odnomomentnoe issledovanie ispol'zovaniya antimikrobnykh preparatov v mnogoprofil'nykh stacionarakh Rossijskoj Federacii. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* 2017; 26: 2: 62–69. [in Russian]
9. Ansari F., Ertell M., Goossens H. et al. The European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) point-prevalence survey of antibacterial use in 20 European hospitals in 2006. *Clin Infect Dis* 2009; 49, 1496–1504. Doi: 10.1086/644617
10. Versporten A., Zarb P., Caniaux I. et al. The Global Point Prevalence Survey of Antimicrobial Consumption and Resistance (Global-PPS) in 395 hospitals worldwide. *Proceedings of the 28th ECCMID*, 21–24 April 2018, Madrid, Spain. P0145A.
11. Armstrong G.L., Conn L.A., Pinner R.W. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *JAMA* 1999; 281: 61–66.
12. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. — 2017. — Т. 19. — № 1. — С. 49–56. / Sukhorukova M.V., Ejdel'shtejn M.V., Skleenova E.Jyu. i dr. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtammov Enterobacteriaceae v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya «MARAFON» 2013–2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2017; 19: 1: 49–56. [in Russian]
13. Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Pseudomonas aeruginosa в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. — 2017. — Т. 19. — № 1. — С. 37–41. / Ejdel'shtejn M.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Jyu. i dr. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtammov Pseudomonas aeruginosa v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya «MARAFON» 2013–2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2017; 19: 1: 37–41. [in Russian]
14. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Acinetobacter spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. — 2017. — Т. 19. — № 1. — С. 42–48. / Sukhorukova M.V., Ejdel'shtejn M.V., Skleenova E.Jyu. i dr. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtammov Acinetobacter spp. v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya «MARAFON» 2013–2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2017; 19: 1: 42–48. [in Russian]
15. Романов А.В., Дехнич А.В., Сухорукова М.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Staphylococcus aureus в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. — 2017. — Т. 19. — № 1. — С. 57–62. / Romanov A.V., Dekhnich A.V., Sukhorukova M.V. i dr. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtammov Staphylococcus aureus v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya «MARAFON» 2013–2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2017; 19: 1: 57–62. [in Russian]
16. Skleenova E., Sukhorukova M., Timokhova A. et al. Sharp Increase in Carbapenem-Non-Susceptibility and Carbapenemase Production Rates in Nosocomial Gram-Negative Bacteria in Russia over the Last Decade. *Proceedings of 53rd ICAAC*; 2013 Sep 10–13; Denver, USA. C2-1092.
17. Harbarth S., Balkhy H.H., Goossens H. et al. Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrob Resist Infect Control* 2015; 4: 49.
18. Seaton R.A., Nathwani D., Burton P. et al. Point prevalence survey of antibiotic use in Scottish hospitals utilising the Glasgow Antimicrobial Audit Tool (GAAT). *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 693–699.
19. Zarb P., Goossens H. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): value of a point-prevalence survey of antimicrobial use across Europe. *Drugs* 2011; 71: 745–755.
20. Paterson D.L. «Collateral damage» from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: Suppl 4: 341–345.
21. Saurina G., Quale J.M., Manikal V.M. et al. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 895–898.
22. Lautenbach E., Patel J.B., Bilker W.B. et al. Extended spectrum beta-lactamase-producing E.coli and K.pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1162–1171.

23. Tacconelli E., De Angelis G., Cataldo M.A. et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 26-38.
24. Fridkin S.K., Edwards J.R., Courval J.M. et al. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 US adult intensive care unit. Ann Intern Med 2001; 135: 175-183.
25. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей: российские национальные рекомендации. Изд. 2. Под ред. Б.Р. Гельфанда, В.А. Кубышкина, Р.С. Козлова, Н.Н. Хачатрян. М.: МАИ, 2015. / Khirurgicheskie infekcii kozhi i myagkikh tkaney: rossijskie nacional'nye rekomendacii. Izd. 2. Pod red. B.R. Gel'fanda, V.A. Kubyshkina, R.S. Kozlova, N.N. Khachatryan. M.: MAI, 2015. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рачина Светлана Александровна — д. м. н., ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Москва

Белькова Юлия Андреевна — ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Смоленск

Козлов Роман Сергеевич — ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Смоленск

Аникеев Андрей Сергеевич — ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Москва

Толтыго Алексей Владимирович — ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Смоленск

Бурасова Елена Геннадьевна — ГАУЗ «РКБ им. Н. А. Семашко», Улан-Удэ

Ежова Людмила Георгиевна — ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Москва; ГБУЗ «ГКБ им. В. В. Виноградова», Москва

Елохина Елена Васильевна — БУЗ Омской области «Областная клиническая больница», Омск

Мищенко Владимир Михайлович — ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» (г. Смоленск), Смоленск

Ни Оксана Геннадьевна — ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Краснодар

Пенжоян Григорий Артемович — ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Краснодар

Свентицкая Екатерина Евгеньевна — ГАУЗ «РКБ им. Н. А. Семашко», Улан-Удэ

Стреж Юлия Александровна — ОГАУЗ «Томская областная клиническая больница», Томск

Шегимова Вера Дандоповна — ГАУЗ «РКБ им. Н. А. Семашко», Улан-Удэ

Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий

Т. А. ЕФИМЕНКО, Л. П. ТЕРЕХОВА, *О. В. ЕФРЕМЕНКОВА

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Current State the Problem of Antibiotic Resistance of Pathogens

T. A. EFIMENKO, L. P. TEREKHOVA, O. V. EFREMENKOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Рассмотрена проблема антибиотикорезистентности патогенных бактерий, приведены данные по антибиотикам, внедрённым в медицинскую практику с 2000 г. в мире, сведения о существующих программах и стратегиях по борьбе с антибиотикорезистентностью.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, патогенные бактерии, антибиотики.

The problem of antibiotic resistance of pathogenic bacteria is considered, data on antibiotics introduced into medical practice since 2000 in the world, information about existing programs and strategies to prevention antibiotic resistance are given.

Keywords: antibiotic resistance, pathogens, antibiotics.

Эра антибиотиков началась в 1928 г. с открытия А. Флемингом пенициллина. Однако первые сообщения об устойчивости бактерий к пенициллину появились уже в 1940 г. ещё до начала его широкого применения в клинической практике (рис. 1). С тех пор проблема антибиотикорезистентности усиливается с каждым годом. По оценке Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC — Centers for Disease Control and Prevention) только в США ежегодно резистентными штаммами инфицируются около 2 млн человек, из которых 23000 умирают [1]. По прогнозам к 2050 г. в мире смертность от инфекционных заболеваний, не поддающихся антибиотикотерапии, составит 10 млн человек в год и выйдет на одно из первых мест наравне с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями [2].

В 2009 г. Американское общество инфекционных болезней [3] выделило шесть особо опасных антибиотикорезистентных патогенных бактерий, объединённых в группу ESKAPE (эти микроорганизмы в процессе селекции приобрели свойство ускользать — escape — от действия современных антибиотиков): *Enterococcus faecium* (VRE), *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella* spp. и *Escherichia coli* (с расширенным спектром

Год выявления устойчивости к антибиотикам	Год введения антибиотика в медицинскую практику
Пенициллин - R <i>Staphylococcus</i> sp. 1940	1943 Пенициллин
	1950 Тетрациклин
	1953 Эритромицин
Тетрациклин - R <i>Shigella</i> sp. 1959	1960 Метипиллин
Метипиллин - R <i>Staphylococcus</i> sp. 1962	
Пенициллин - R пневмококки 1965	1967 Гентамицин
Эритромицин - R <i>Streptococcus</i> sp. 1968	1972 Ванкомицин
Гентамицин - R <i>Enterococcus</i> sp. 1979	
Цефтазидим - R <i>Enterobacteriaceae</i> 1987	1985 Имипенем и цефтазидим
Ванкомицин - R <i>Enterococcus</i> sp. 1988	
Левифлоксацин - R пневмококки 1996	1996 Левифлоксацин
Имипенем - R <i>Enterobacteriaceae</i> 1998	
XDR туберкулез 2000	2000 Линезолид
Линезолид - R <i>Staphylococcus</i> sp. 2001	
Ванкомицин - R <i>Staphylococcus</i> sp. 2002	2003 Дактомицин
PDR <i>Acinetobacter</i> sp. и <i>Pseudomonas</i> sp. 2004/5	
Цефтриаксон - R <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 2009	2010 Цефтаролин
PDR <i>Enterobacteriaceae</i>	
Цефтаролин - R <i>Staphylococcus</i> sp. 2011	

Рис. 1. Временная шкала развития устойчивости к антибиотикам [1].

Примечание. R (resistant) — резистентность; XDR (extensively drug-resistant) — экстенсивная резистентность; PDR (pan-drug-resistant) — панрезистентность.

бета-лактамаз — extended spectrum beta-lactamases (ESBL)), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. Однако в феврале 2017 г. опубликовано сообщение ВОЗ уже о двенадцати

Таблица 1. Антибиотикорезистентность бактерий, представляющих угрозу для жизни человека [1]

Штаммы бактерий	Инфекции, вызванные данными штаммами	Антибиотики, к которым выражена устойчивость
Критический уровень опасности		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Пневмонии, сепсис	Все или почти все медицинские антибиотики, включая карбапенемы
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Пневмония, инфекции мочевыводящих путей и крови (при использовании катетеров)	Все или почти все медицинские антибиотики, включая аминогликозиды, цефалоспорины, фторхинолоны и карбапенемы
Enterobacteriaceae	Госпитальные инфекции	Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы
Высокий уровень опасности		
<i>Enterococcus faecium</i>	Госпитальные инфекции, включая инфекции крови и мочевых путей при хирургических вмешательствах	МЛУ, в том числе к ванкомицину
<i>Staphylococcus aureus</i>	Кожные и раневые инфекции, пневмония	MRSA; VRSA
<i>Helicobacter pylori</i>	Гастрит, язвенная болезнь и аденокарцинома желудка	Кларитромицин и левофлоксацин
<i>Campylobacter</i>	Диарея (часто с кровью), лихорадка, в редких случаях, временный паралич	Азитромицин или ципрофлоксацин
<i>Salmonella</i> spp.	Диарея (иногда с кровью), лихорадка, сепсис	Цефтриаксон и ципрофлоксацин
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Гонорея; воспаление уретры, шейки матки, прямой кишки	Цефалоспорины, азитромицин, тетрациклин
Средний уровень опасности		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Бактериальная пневмония, менингит, инфекции уха, сепсис	Пенициллин, антибиотики группы эритромицина (амоксиклав и азитромицин)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Поражение органов дыхания, центральной нервной системы и развитие гнойных очагов в различных органах	Ампициллин
<i>Shigella</i> spp.	Диарея (иногда с кровью), лихорадка и боли в животе, реактивный артрит	Ампициллин, триметоприм/сульфаметоксазол, ципрофлоксацин, азитромицин

Примечание. МЛУ — множественная лекарственная устойчивость; MRSA — метициллин-резистентный золотистый стафилококк (methicillin-resistant *S.aureus*); VRSA — ванкомицин-резистентный золотистый стафилококк (vancomycin-resistant *S.aureus*).

особо опасных для человека антибиотикорезистентных бактериях [4]. По степени опасности патогенные микроорганизмы были разделены на три группы (критический, высокий и средний уровни опасности) в зависимости от того, насколько осуществимо в современных условиях лечение вызываемой ими инфекции. В первую группу вошли бактерии с множественной лекарственной резистентностью, в частности с устойчивостью к карбапенемам и цефалоспорином третьего поколения: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и Enterobacteriaceae. Во вторую группу включены бактерии *Enterococcus faecium* (VR), *Staphylococcus aureus* (MR, VR, VI), *Helicobacter pylori*, устойчивые к фторхинолонам *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. и *Neisseria gonorrhoeae*. К третьей группе отнесены *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Shigella* sp. (табл. 1). Таким образом, одной из важнейших проблем современного здравоохранения является преодоление антибиотикорезистентности бактерий. Этого можно добиться за счёт внедрения в медицинскую практику новых эффективных природных антибиотиков, химической модификации известных антибиотиков, разработки ксенобиотиков, создания направленных средств доставки.

За последние 30 лет количество антибактериальных средств для системного применения,

одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA — Food and Drug Administration), уменьшилось на 75%. С 2000 по 2017 гг. в мировую медицинскую практику были введены всего лишь 31 новый антибиотик и 2 комбинированных препарата (бета-лактамы/ингибитор бета-лактамаз), одобренных национальными агентствами. Из них новыми природными антибиотиками являются только 2, 12 являются продуктами трансформации природных антибиотиков и 17 соединений синтезированы искусственно. Из 17 синтетических новых антибиотиков, двенадцать — хинолоны, два — оксазолидиноны, остальные являются единичными примерами нитроимидазола, тио-семикарбазона и диарилхинолина. Из двух природных антибиотиков и 12 полусинтетических к бета-лактамам антибиотикам относятся шесть и три относятся к классу гликопептидов, остальные пять принадлежат к различным другим классам [5–8]. На рис. 2 и в табл. 2 представлены антибиотики, одобренные для клинического применения в период с 2000 по 2017 гг. [8–12]. Среди них лишь один препарат разработан в России — перхлорон (тиоуреидоимино-метилпиридиния перхлорат), который является пероральным лекарственным средством, созданным АО «Фармасинтез» (Москва, Россия) и одобренным в 2012 г. в России для лечения

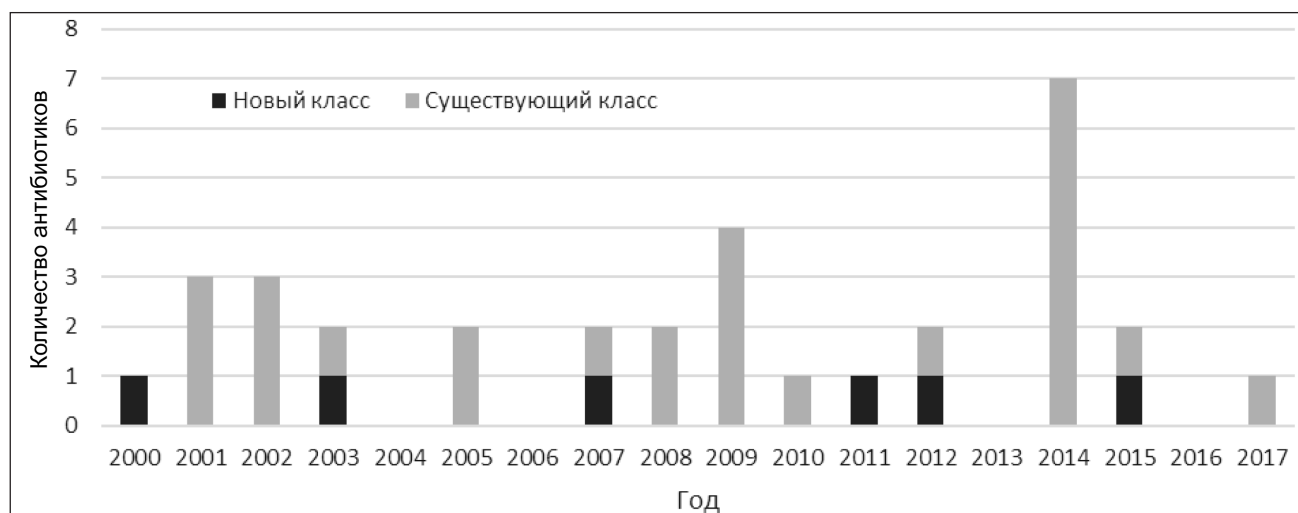


Рис. 2. Количество антибиотиков, одобренных для применения в период 2000—2017 гг. [8—12].

туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью [8, 13].

Сложившийся кризис беспокоит специалистов в области бактериологии, осознающих, что создается катастрофическое положение в области лечения инфекционных заболеваний. С целью предотвращения развития антибиотикорезистентности разрабатываются программы и стратегии, создаются общества и ассоциации, принимаются декларации, важнейшими из которых являются:

- «Копенгагенские рекомендации», принятые странами Европейского Союза, 1998 г.;
- «План деятельности общественного здравоохранения по борьбе с антибиотикорезистентностью», предложенный Американским обществом микробиологов и рядом ведомств США, 2000 г.;
- «Всемирная декларация по борьбе с антимикробной резистентностью», принятая в Канаде, 2002 г.;
- программа «10 X '20», рассчитанная на разработку 10 новых антибиотиков, эффективных и пригодных для системного применения к 2020 г. [14, 15];
- «Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам», ВОЗ, 2015 г.;
- «Карта устойчивости», содержащая данные об устойчивости по всему миру, создана Центром динамики, экономики и политики заболеваний (CDDEP — The Center For Disease Dynamics, Economics & Policy) [16].

Создана коалиция из 40 малых и средних биофармацевтических компаний, ориентированных на открытие и разработку новых противомикробных препаратов, альянс Биотехнологов Европы, исследующих антимикробную устойчивость (BEAM — Biotechs from Europe innovating in Anti-Microbial Resistance). Большинство компаний —

членов BEAM уделяют основное внимание разработке продуктов, эффективных в отношении 12 патогенов по последнему списку ВОЗ [4]. В частности, члены альянса BEAM разрабатывают инновационные соединения с совершенно новыми механизмами действия — лекарства, которые срочно необходимы для борьбы с растущим числом полирезистентных микроорганизмов [17].

Всемирная ассамблея здравоохранения в мае 2015 г. приняла глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам и сформулировала пять целей [18]:

- Повышение осведомленности и улучшение понимания вопросов устойчивости к противомикробным препаратам посредством эффективной коммуникации, образования и профессиональной подготовки.
- Накопление знаний и фактологической базы за счёт научных исследований и эпиднадзора. Создана система эпиднадзора за устойчивостью к противомикробным препаратам (GLASS), которая будет поддерживать стандартизированный подход к сбору, анализу и обмену данными об устойчивости к противомикробным препаратам на глобальном уровне [19].
- Сокращение числа случаев инфицирования путём создания хороших санитарно-гигиенических условий и принятие эффективных мер по профилактике инфекций.
- Оптимизирование использования противомикробных препаратов в охране здоровья человека и животных.
- Подготовка экономического обоснования планомерных инвестиций с учётом потребностей всех стран, увеличение инвестиций в разработку новых лекарственных средств, диагностических инструментов и вакцин и в реализацию других мер.

В этом плане подчёркивается необходимость разработки эффективной концепции «единого

Таблица 2. Антибиотики, введенные в мировую медицинскую практику 2000–2017 гг. [8–12]

Название антибиотика	Год, страна	Класс антибиотика	Происхождение антибиотика (продуцент)	Применение
Линезолид	2000 США	Оксазолидиноны	Синтетический	Пневмония, инфекции кожи и инфекции, вызванные <i>Enterococcus faecium</i> (VR)
Телитромицин	2001 ЕС	Макролиды	Полусинтетический (актинобактерия)	Инфекции верхних и нижних дыхательных путей
Биапенем	2001 Япония	Карбапенемы	Полусинтетический (актинобактерия)	Внутрибрюшные инфекции, инфекции нижних дыхательных путей или осложнённые инфекции мочевых путей
Эртапенем	2001 США	Карбапенемы	Полусинтетический (актинобактерия)	Внебольничная пневмония; кожные, внутрибрюшные, почечные, послеоперационные гинекологические инфекции, инфекции мочевыводящих путей
Прулифлоксацин	2002 Япония	Фторхинолоны	Синтетический	Острый хронический бронхит, осложнённые инфекции нижних мочевыводящих путей
Пазуфлоксацин	2002 Япония	Фторхинолоны	Синтетический	Инфекции, вызванные грамположительными и грамотрицательными бактериями
Балофлоксацин	2002 Южная Корея	Фторхинолоны	Синтетический	Инфекции мочевыводящих путей
Даптомицин	2003 США	Липопептиды	Природный (актинобактерия)	Осложнённые инфекции кожи и инфекции крови
Гемифлоксацин	2003 США	Фторхинолоны	Синтетический	Внебольничная пневмония, обострение хронического бронхита, острый синусит
Дорипенем	2005 Япония	Карбапенемы	Полусинтетический (актинобактерия)	Внутрибольничная пневмония, осложнённые инфекции мочевыводящих путей
Тигециклин	2005 США	Тетрациклины	Полусинтетический (актинобактерия)	Бактериальная пневмония, осложнённые инфекции кожи, внутрибрюшные инфекции
Ретапамулин	2007 США	Плевромутилины	Полусинтетический (гриб)	Импетиго, вызванное <i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Streptococcus pyogenes</i>
Гареноксацин	2007 Япония	Фторхинолоны	Синтетический	Инфекции верхних и нижних дыхательных путей
Цефтобипрола медокарил	2008 Канада	Цефалоспорины	Полусинтетический (гриб)	Осложнённые инфекции кожи
Ситафлоксацин	2008 Япония	Фторхинолоны	Синтетический	Внебольничная пневмония, инфекции дыхательных путей, осложнённые инфекции мочевыводящих путей
Тебипенем пивоксил	2009 Япония	Карбапенемы	Полусинтетический (актинобактерия)	Отоларингологические и респираторные инфекции, вызванные устойчивыми штаммами <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Телаванцин	2009 США	Гликопептиды	Полусинтетический (актинобактерия)	Осложнённые инфекции кожи
Антофлоксацин	2009 Китай	Фторхинолоны	Синтетический	Обостренный цистит, пиелонефрит, обострение хронического бронхита
Бецифлоксацин	2009 США	Фторхинолоны	Синтетический	Бактериальный конъюнктивит
Цефтаролин фосамил	2010 США	Цефалоспорины	Полусинтетический (гриб)	Бактериальные инфекции кожи и бактериальная пневмония
Фидаксомицин	2011 США	Тиакумицины	Природный (актинобактерия)	<i>Clostridium difficile</i> -ассоциированная диарея
Бедаквилин	2012 США	Диарилхинолины	Синтетический	Туберкулёз
Перхлозон	2012 Россия	Тиосемикарбазоны	Синтетический	Туберкулёз
Тедизолид	2014 США	Оксазолидиноны	Синтетический	Бактериальные инфекции кожи
Деламанид	2014 ЕС	Нитроимидазолы	Синтетический	Туберкулёз
Далбаванцин	2014 США	Гликопептиды	Полусинтетический (актинобактерия)	Бактериальные инфекции кожи
Оритаванцин	2014 США	Гликопептиды	Полусинтетический (актинобактерия)	Бактериальные инфекции кожи
Цефтолозан/тазобактам	2014 США	Цефалоспорины + ингибитор бета-лактамаз	Комбинированный препарат	Внутрибрюшные инфекции и инфекции мочевыводящих путей
Немоноксацин	2014 Тайвань	Хинолоны	Синтетический	Внебольничная пневмония, инфекции кожи и мягких тканей
Финафлоксацин	2014 США	Фторхинолоны	Синтетический	Острый внешний отит, вызванный чувствительными штаммами <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i>
Цефтазидим/авибактам	2015 США	Цефалоспорины + ингибитор бета-лактамаз	Комбинированный препарат	Внутрибрюшные инфекции и инфекции мочевыводящих путей
Озеноксацин	2015 Япония	Хинолоны	Синтетический	Бактериальные инфекции кожи
Делафлоксацин	2017 США	Фторхинолоны	Синтетический	Бактериальные инфекции кожи

здравоохранения», включающей координацию среди многочисленных международных секторов и субъектов, связанных с медициной и ветеринарией, сельским хозяйством, финансами, окружающей средой и хорошо информированных потребителей. Крайне необходимо, чтобы разработка и производство антибиотиков поддерживались в масштабе, который соответствует нашим возрастающим требованиям. Несомненно, разработка и внедрение в медицинскую практику новых анти-

биотиков должны сопровождаться мерами по контролю за чрезмерным и неоправданным использованием антибиотиков, профилактикой инфекций и надлежащей гигиеной питания.

Благодарность. Авторы выражают благодарность д. м. н. Э. Р. Переверзевой за ценные замечания при работе над текстом обзора. Работа выполнена частично по научному проекту РФФИ № 17-00-00393\17 от 16.11.2017.

ЛИТЕРАТУРА

- Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.
- O'Neill J. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations, 2016 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf.
- Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! Clin Infect Dis 2009; 48 (1): 1–12.
- World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short-Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.
- Butler M.S., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. J Antibiot 2011; 64 (6): 413–425.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. J Antibiot 2013; 66 (10): 571–591.
- Newman D.J., Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod 2016; 79: 629–661.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. J Antibiot 2017; 70 (1): 3–24.
- CenterWatch [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/>.
- FDA Approved Drug Products [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>.
- KEGG DRUG Database [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.kegg.jp/kegg/drug/drug_ja.html.
- Pharmacodia [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://en.pharmacodia.com/>.
- Gopal P., Dick T. The new tuberculosis drug Perchlozone® shows cross-resistance with thiacetazone. Int J Antimicrob Agents 2015; 45 (4): 430–433.
- Gilbert D.N., Guidos R.J., Boucher H.W. et al. The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. Clin Infect Dis 2010; 50 (8): 1081–1083.
- So A.D., Gupta N., Brahmachari S.K. et al. Towards new business models for R&D for novel antibiotics. Drug Resist Updat 2011; 14 (2): 88–94.
- The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP). Resistance Map. <https://resistancemap.cddep.org/>.
- BEAM (Biotech companies in Europe combating AntiMicrobial Resistance) Alliance. <http://beam-alliance.eu>.
- World Health Organization (WHO). Global action plan on antimicrobial resistance. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
- Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Глобальная система эпиднадзора за устойчивостью к противомикробным препаратам (GLASS). <http://www.who.int/drugresistance/surveillance/ru/>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ефименко Татьяна Александровна — н. с., Сектор поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Терехова Лариса Петровна — д. б. н., профессор, руководитель Отдела микробиологии, заведующий Лабораторией

таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Ефременкова Ольга Владимировна — к. б. н., руководитель Сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Вторичные метаболиты растений: механизмы антибактериального действия и перспективы применения в фармакологии

Е. В. БУДАНОВА¹, *К. Л. ГОРЛЕНКО^{1,2}, Г. Ю. КИСЕЛЕВ^{1,2}

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

² Международная школы «Медицина Будущего», Москва

Secondary Plant Metabolites: Mechanisms of Antibacterial Action and Perspectives of Application in Pharmacology

E. V. BUDANOVA¹, *K. L. GORLENKO^{1,2}, G. YU. KISELEV^{1,2}

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

² International school «Medicine of the Future», Moscow

Антибиотикорезистентность — одна из мировых проблем XXI века, возникающая в результате активации приспособительных механизмов в структурах бактериальной клетки. Вторичные метаболиты растений синтезируются как побочные продукты их обмена веществ. Выделение вторичных метаболитов в окружающую среду связано с активацией защитных механизмов в клетках растений. В ходе исследования данных литературы были выделены следующие механизмы антибактериального действия вторичных метаболитов растений: механизмы повреждения клеточной стенки и цитоплазматической мембраны бактерий, нарушения энергетического обмена и процессов метаболизма, а также синтеза ДНК. Обобщены принципы работы систем «метаболит–метаболит» и «метаболит–антибиотик», что позволяет судить о возможности потенцирования действия антибиотиков вторичными метаболитами растений.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, растения, вторичные метаболиты.

Antibiotic resistance is one of the world problems of the XXI century, resulting from the activation of adaptive mechanisms in the structures of bacterial cells. Secondary metabolites of plants are synthesized as byproducts of their metabolism. The release of secondary metabolites into the environment is associated with the activation of protective mechanisms in plant cells. In the course of the study of the literature data the following mechanisms of antibacterial action of secondary metabolites of plants were identified: mechanisms of damage to the cell wall and cytoplasmic membrane of bacteria, violations of energy metabolism and metabolic processes, as well as DNA synthesis. The principles of the systems «metabolite-metabolite» and «metabolite-antibiotic» are generalized, which makes it possible to judge the possibility of potentiating the action of antibiotics by secondary metabolites of plants.

Keywords: antibiotic resistance, plants, secondary metabolites.

Введение

Открытие пенициллина А. Флемингом (1928 г.) положило начало эре антибиотиков [1] и позволило решить проблему этиотропной терапии инфекционных заболеваний. Однако человечество столкнулось с проблемой антибиотикорезистентности (MDR — Multidrug Resistance) — устойчивости микробов к действию различных противомикробных препаратов. Вот уже несколько десятилетий учёные ищут решение данной проблемы, прибегая к различным сферам естественнонаучного знания. Наша исследовательская команда предлагает рассматривать вторичные метаболиты растений (ВМР) как потенциальное средство для

борьбы с антибиотикорезистентностью. Для обоснования предложенного метода потенцирования действия антибиотиков поставлена цель — обозначить молекулярные механизмы, благодаря которым ВМР могут оказаться эффективными в данном направлении.

Поиск литературы проводился в базах данных NCBI MedLine, Scopus, Embase, Elsevier. Отбор информации в базах данных Scopus, Embase и Elsevier проводился по ключевым словам: «antibacterial action», «plant secondary metabolites», «phytochemicals», «molecular mechanism», «mode of action», «multidrug resistance». В базе данных NCBI MedLine использовался поиск по приведённым ключевым словам, а также по MeSH-термам: «drug resistance», «anti-bacterial agents», «antibiotics», «plant secondary metabolism». Резюме 69 статей, отобранных на основе ключевых слов и

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: E-mail: mr.gorlenko@mail.ru

совпадений тегов, были подвергнуты анализу: в результате были отобраны 36 статей, исходя из данных которых был произведен анализ и синтез информации, входящей в данную статью.

Молекулярные механизмы антимикробного действия ВМР

Клеточная стенка. Вторичные метаболиты растений — химически неоднородная группа веществ [2], которые, вероятно, могут оказывать специфическое действие на микроорганизмы в зависимости от структуры конкретного класса соединений.

Исследования показали, что различные ВМР способны, подобно антибиотикам, нарушать целостность клеточной стенки и цитоплазматической мембраны бактерий или грибов [3–6]; ингибировать работу системы эффлюкса [3–5]; нарушать синтез РНК и ДНК в клетке [6–10]; вызывать коагуляцию компонентов цитоплазмы; угнетать метаболизм клетки путём инактивации ферментов бактерий (β -лактамаза) [11].

Некоторые классы ВМР обладают узким спектром действия на грамположительные бактерии, в то время, как другие способны действовать на грамположительные и грамотрицательные бактерии [5]. Различная чувствительность бактерий к ВМР определяется морфологическими различиями между строением клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Далее более детально рассматриваются представленные процессы на примере бактериальных клеток.

Клеточная стенка грамположительных бактерий. Грамположительные бактерии особенно восприимчивы к воздействию ВМР, поскольку в отличие от грамотрицательных бактерий не имеют наружной мембраны, а пептидогликан не является эффективным барьером.

Составными частями пептидогликана являются молекулы N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, соединённые β -1,4-гликозидными связями. Остатки N-ацетилмуравовой кислоты сшиты между собой олигопептидами, обычно состоящими из L-аланина, D-аланина, D-глутаминовой кислоты, L-лизина, мезодиаминопимелиновой кислоты. Характерной особенностью клеточной стенки грамположительных бактерий является наличие в нем тейхоевых и липотейхоевых кислот.

Пептидогликановый слой не является надёжным барьером для ВМР, что позволяет им проникать во внутриклеточное пространство бактерии, впоследствии — дезинтегрировать компоненты ЦПМ, ингибировать синтез белков, входящих в состав клеточной стенки.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий имеет более сложное строение: помимо не-

большой прослойки пептидогликана, она имеет внешнюю фосфолипидную мембрану, несущую структурные липополисахаридные компоненты (ЛПС), что делает клеточную стенку наименее проницаемой для гидрофобных веществ, в то время как белки-порины, выстилающие поры клеточной стенки грамотрицательных бактерий, определяют избирательную проницаемость для гидрофильных веществ.

Основной механизм действия ВМР в отношении грамотрицательных бактерий — это их пермеабилизирующее действие. Связываясь с фосфолипидами наружной мембраны, они способны изменять проницаемость наружной мембраны, что приводит к осмотическому шоку и гибели бактериальной клетки. Показано, что подобным действием обладают сесквитерпеноиды эфирных масел: например, цис- и транс-неролидол, фарнезол, бизаболон, апристон, гермакрин, тотарол и другие.

Экспериментальные исследования показали эффективность применения ВМР типа карвакрола или тимола против *S.aureus* и пептида, извлечённого из моринги масличной (лат. *Moringa oleifera*), — против *P.aeruginosa* и *S.typhimurium* [12, 13]. Аналогичный механизм реализуется в отношении цитоплазматической мембраны.

Цитоплазматическая мембрана. ВМР способны нарушать целостность цитоплазматической мембраны микроорганизмов путём разобщения её структурных элементов.

Данный механизм определяет антибактериальные свойства смеси танинов и сапонинов. Сапонины являются положительно заряженными молекулами способными изменять проницаемость клеточной стенки бактерий, после чего они связываются с цитоплазматической мембраной и нарушают её целостность, что приводит к лизису клетки.

Танины — полифенолы, обладающие способностью к ингибированию роста бактерий посредством блокирования ферментов метаболизма, и, что немаловажно, характеризующиеся отрицательным зарядом молекулы за счёт наличия большого количество гидроксильных радикалов в своей химической структуре [7, 14].

В комбинации эти вещества, танины и сапонины, способны оказывать мощное влияние на цитоплазматическую мембрану, образуя в ней поры, что приводит к дестабилизации мембраны, осмотическому шоку и лизису бактериальной клетки.

Процесс взаимодействия ВМР и фосфолипидной мембраны бактерий характеризуется двумя последовательными стадиями (рис. 1):

1. Положительно заряженные молекулы (сапонины) притягиваются к отрицательно заряженным фосфатным группам фосфолипидов, после чего происходит связывание сапонины с мем-

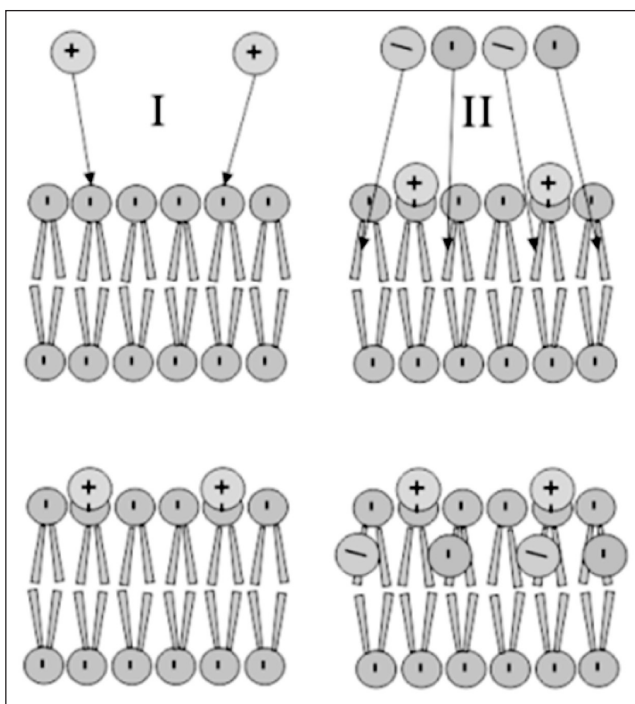


Рис. 1. Процесс взаимодействия ВМР и фосфолипидов цитоплазматической мембраны бактерий.

I — изображен первый этап взаимодействия ВМР с фосфолипидами ЦПМ. Круг с символом «+» обозначает положительно заряженную молекулу сапонина; II — изображен второй этап взаимодействия ВМР с фосфолипидами ЦПМ. Круги с символами «-» и «x» обозначают отрицательно заряженные и гидрофобные молекулы танинов, соответственно.

браной, что приводит к её дезорганизации и образованию дестабилизированных участков, неспособных выполнять основную функцию ЦПМ.

2. Через эти участки внутрь устремляются отрицательно заряженные молекулы танинов,

которые, взаимодействуя с алифатическими частями фосфолипидов, окончательно дестабилизируют цитоплазматическую мембрану [3, 6].

Периплазматическое пространство: инактивация β -лактамаз. Как известно, одним из основных факторов формирования антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий в отношении бета-лактамных антибиотиков является продукция и накопление в периплазматическом пространстве обширной группы ферментов — β -лактамаз.

Согласно классификации Амблера, выделяются 4 типа β -лактамаз бактерий: типы А, В и D, содержащие в активном центре аминокислоту серин [11], и тип С, содержащий в активном центре ионы цинка [15]. Предполагают, что в зависимости от типа действующей в конкретном случае β -лактамазы ВМР способны реализовывать различные молекулярные механизмы блокировки данных ферментов. Так, например, β -лактамазы А, В и D ингибируются в ходе гидрофобного взаимодействия с полифенольными соединениями, относящимися к подклассу флавонолов (производные флавонола с восстановленной карбонильной группой) [16]. β -лактамазы типа С ингибируются за счёт гидрофобного взаимодействия серина активного центра фермента с фенольными компонентами экстракта [16].

Эффлюкс. В бактериальной клетке обнаружено огромное количество специфических эффлюкс-насосов, которые нацелены на активный перенос веществ (включая антимикробные препараты) в окружающую среду. Эти насосы различаются не только структурой, но и энергетическими субстратами, используемыми для переноса. Так, на рис. 2 и в табл. 1 представлена характеристика некоторых семейств эффлюкс-насосов, функционирующих в клетках бактерий.

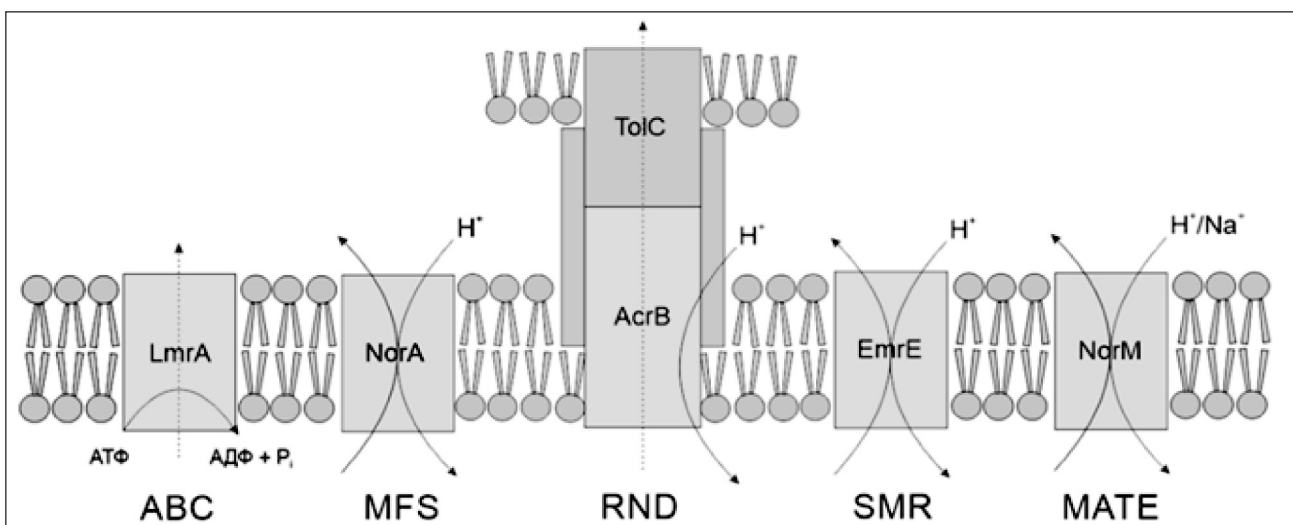


Рис. 2. Схема функционирования эффлюкс-насосов в бактериальной клетке.

ABC — ATP-Binding Cassette; MFS — Major Facilitator Superfamily; RND — Resistance/nodulation/division Superfamily; SMR — Small Multidrug Resistance Subfamily; MATE — Multidrug and Toxic Compound Extrusion Subfamily. Стрелками обозначено направление переноса частиц насосом.

Таблица 1. Характеристика некоторых семейств эффлюкс-насосов, имеющих в клетке бактерий

Полное название	Сокращенное название	Пример белкового компонента структуры	Энергетический субстрат переноса	Пример микроорганизма, источник литературы
ATP-Binding Cassette	ABC	LmrA	ATP	<i>E.coli</i> <i>Mycobacterium</i> spp. [17, 18]
Major Facilitator Superfamily	MFS	NorA	антипорт с H^+	<i>S.aureus</i> [19]
Resistance/nodulation/division Superfamily	RNDS	AcrA AcrB AcrZ TolC	антипорт с H^+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhimurium</i> [20, 21]
Small Multidrug Resistance Subfamily	SMRS	EmrE TetK	антипорт с H^+	<i>Mycobacterium</i> spp. [18]
Multidrug and Toxic Compound Extrusion Subfamily	MATE	NorM	антипорт с Na^+/H^+	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> [22]

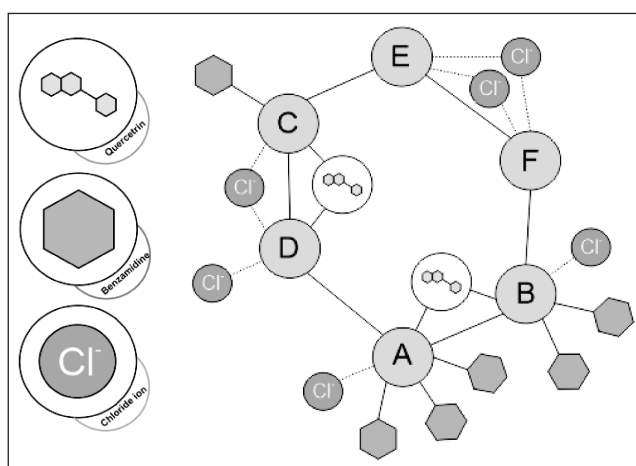


Рис. 3. Ингибирование активности HpfabZ-белка *H.pylori* кверцетрином.

Ингибирование феномена эффлюкса при использовании ВМР возможно следующими двумя способами:

1. Путём закупорки канала, образованного белками, входящими в структуру насоса. Данный механизм осуществляется гидрофобными (липофильными) частицами, к которым относятся терпены (в особенности, монотерпены, дитерпены и сесквитерпены). Примером реализации данного механизма может служить действие тотарола на *S.aureus*. Считается, что это происходит путём угнетения NorA-насоса, когда частицы ВМР являются конкурентными ингибиторами эффлюкс-насосов. Кроме того, данный механизм может осуществляться полифенольными соединениями, способными напрямую связываться со структурными белками канала при помощи водородных и ионных связей, изменяя их конформацию и нарушая их функционирование.

2. Путём нарушения поступления энергетического субстрата. Так как MFS, RNDS, SMRS и MATE эффлюкс-насосы осуществляют свою функцию с использованием энергии протон-движущей силы, любое нарушение транспорта протонов водорода приводит к ингибированию функции H^+ -зависимых переносчиков.

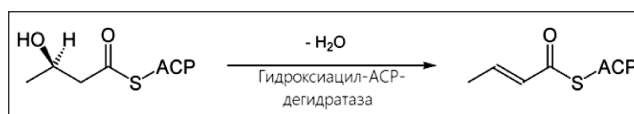


Рис. 4. Реакция-мишень для ингибирования FASII на примере *S.aureus* при использовании экстракта зелёного чая.

Биосинтез жирных кислот. Данный механизм действия ВМР основан на блокировании синтазы жирных кислот II типа (FASII). Наиболее детально он рассмотрен на примере HpfabZ-белка, выделенного из *Helicobacter pylori* (рис. 3).

Реализация данного механизма происходит в ходе реакции дегидратации $HR(OH)-S-ACP$ (R-остаток жирной кислоты, ACP — белковый переносчик) до $R-S-ACP$ (рис. 4). Таким образом действует кверцетин и другие флавонолы, имеющие две модели связывания с активной формой фермента: близ входа в тоннель В, либо рядом с каталитическим участком тоннеля С.

Так же показано ингибирование FASII у *S.aureus* при использовании экстракта зелёного чая (Epicatechin gallate).

Цепь переноса электронов. Процессы энергообеспечения клетки нарушаются ВМР путём уменьшения тока электронов по цепи переноса. Реализация этого механизма осуществляется полифенольными компонентами благодаря их высокой способности к диссоциации с образованием катионов водорода. Нарушение тока электронов по цепи переноса осуществляется за счёт деятельности полифенольных соединений в качестве scavenger-частиц для DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил), обладающего мощными антиоксидантными свойствами [23].

Таким образом, они нарушают переход электронов от одного комплекса к другому, значительно уменьшая выделение и перенос протонов водорода, что в конечном итоге приводит к прерыванию процесса синтеза АТФ и гибели клетки вследствие недостатка энергии [23].

Репликация и транскрипция ДНК. ВМР способны к блокированию репликации и транскрип-

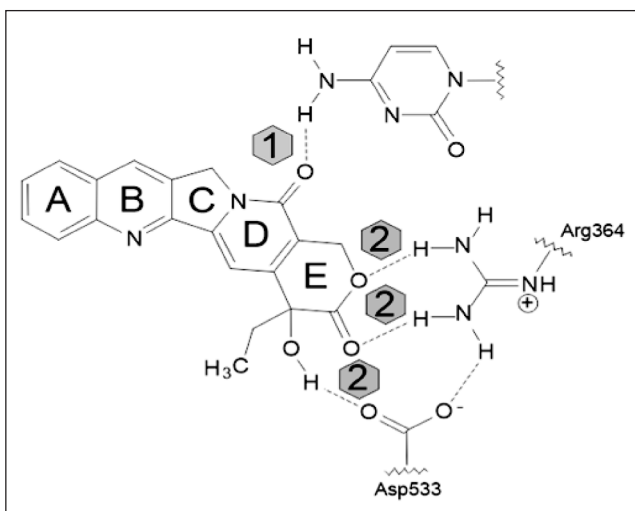


Рис. 5. Схема ингибирования Торо IA камптотецином.

1 — водородная связь, образующаяся между D-кольцом камптотецина и цитозином ДНК; 2 — 3 водородные связи, образующиеся между E-кольцом камптотецина и аминокислотными остатками Торо IA.

ции ДНК путём нарушения её структуры или ингибирования ферментов, вовлечённых в данные процессы.

Первые исследования воздействия ВМР на данные процессы включали вещество алицин — основной компонент измельчённого чеснока. В структуре данной молекулы содержится тиосульфатная группировка ($-S(O)S-$), которая способна вступать во взаимодействие с тиолами ферментов клеток микроорганизмов, вовлечённых в процессы матричных синтезов. После взаимодействия алицина с ферментом первичная структура последнего нарушается, соответственно изменяется конформация и снижается ферментативная активность. Однако ингибирующий эффект алицина обратим, так как тиол-содержащие компоненты (например, глутатион или β -меркаптоэтанол) способны реактивировать тиольные группы ферментов путём вытеснения ингибитора из активного центра [3, 10].

Показано, что берберин (Berberin) — алкалоид, содержащийся в различных частях многих растений, способен проявлять антибактериальные свойства. Он формирует комплекс с ДНК, что негативно сказывается на реализации наследственной информации. Предполагается, что данный механизм основан на гидрофобном взаимодействии молекул берберина и ДНК [9, 24].

Некоторые флавоноиды (например, робинетин, мирицетин и эпигаллотегин) оказывают двойственные эффекты: в экспериментах с *P. vulgaris* применение флавоноидов приводило к угнетению репликации ДНК, в то время как в пробах со *S. aureus* ингибировалась транскрипция [25, 26].

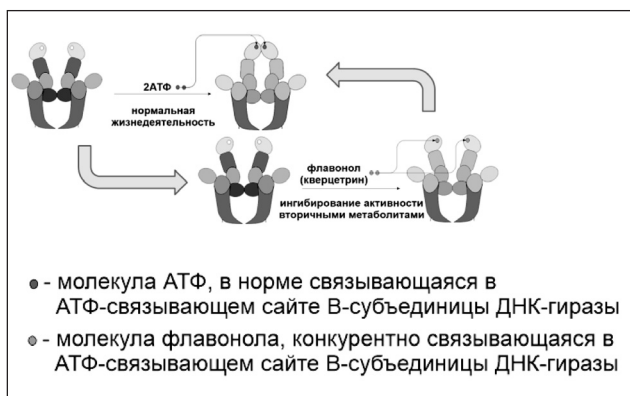


Рис. 6. Схема конкурентного ингибирования ДНК-гиразы бактерий флавонолами.

Предполагается, что В кольцо флавоноидов способно интеркалировать между основаниями ДНК, что нарушает её стэкинг, а также приводит к нарушению функционирования ферментов матричных синтезов.

Камптотецин или его полусинтетические производные иринотекан и топотекан способны связываться с топоизомеразой IA типа (Торо IA), играющей важную роль в расплетании ДНК бактерий в процессе её репликации. Они образуют четыре водородные связи, стабилизирующие структуру комплекса и препятствующие разрушению репликативной вилки (рис. 5). Расплетённая ДНК уязвима для действия нуклеаз, которые повреждают наследственный материал на этом этапе [27].

Флаванолы (например, кверцетин) способны ингибировать ДНК-гиразу (Торо IIА) в клетках *E. coli* (рис. 6). Соединяясь с В-субъединицей фермента в АТФ-связывающем сайте, флаванолы нарушают формирование репликативной вилки и последующую репликацию ДНК бактерий [7].

Перспективы использования вторичных метаболитов растений в фармакологии

Функциональное взаимодействие в системе «метаболит–метаболит». В многочисленных исследованиях было показано, что различные ВМР вступают в функциональные взаимодействия четырех типов с клетками-мишенями (рис. 7) и антибиотиками (рис. 8):

1. Отношения нейтралитета (индифферентности) — определяются в пробах, когда сила действия смеси вторичных метаболитов растений остается неизменной по сравнению с силой действия отдельных компонентов этой смеси [28]. В этом случае нет необходимости использовать эти вещества в комбинации.

2. Отношения аддитивизма — принцип функционального взаимодействия ВМР, когда итоговая сила воздействия смеси равна сумме сил взаимодействий, которые оказывают отдельные

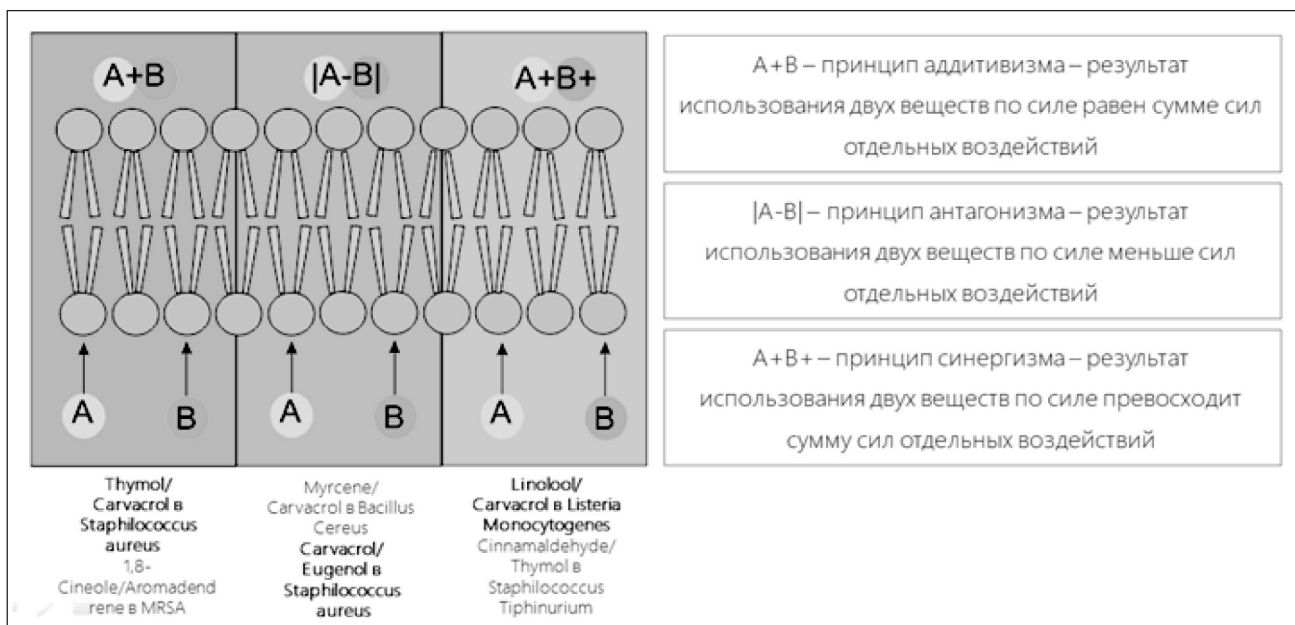


Рис. 7. Принципы функционального взаимодействия в системе «метаболит–метаболит».

компоненты этой смеси [28]. В данный тип функциональных взаимодействий вступают, например, тимол и карвакрол при воздействии на *S.aureus* и *B.cereus* [29].

3. Отношения синергизма — принцип суммации сил взаимодействия компонентов смеси имеет сходство с предыдущим, но отличается тем, что суммарная сила взаимодействий компонентов смеси больше суммы сил воздействий отдельных компонентов смеси [28]. Та же пара веществ (тимол и карвакрол) в отношении *E.coli* проявляют синергические, а не аддитивные свойства [30].

4. Отношения антагонизма — проявляются в уменьшении итоговой силы воздействия смеси по сравнению с силой воздействия того или иного компонента смеси в отдельности [28]. Карвакрол и евгенол при воздействии на *S.aureus*, *B.cereus*, *E.coli* проявляют антагонистические свойства [31].

Процесс лабораторного определения типа функционального взаимодействия смеси может быть осуществлен следующими методами: при использовании принципа «шахматной доски» (Checkerboard) и графическим методом [28].

Метод «шахматной доски». Данный метод основан на определении двух показателей: фракционной ингибирующей концентрации (FIC) и эффекта комбинации (EC).

FIC (табл. 3) вещества рассчитывается как от-

$$FIC = \frac{MKC_c}{MKC_a}$$

ношение: MKC_c (Minimal killing concentration in combination) метаболита при использовании в смеси к MKC_a (Minimal killing concentration alone) метаболита при его отдельном использовании [28].

FIC смеси рассчитывается как сумма FIC её компонентов. Вследствие относительности данного показателя возникает проблема интерпретации полученных результатов.

$$EC = \log(DP_c) - \log(DP_a) = \log\left(\frac{DP_c}{DP_a}\right), \text{ где}$$

EC — эффект комбинации; DP_c — убыль микробной популяции при использовании смеси, %; DP_a — убыль микробной популяции при использовании чистого вещества, %.

Эффект комбинации (EC) — абсолютный показатель, который является разностью десятичных логарифмов изменения численности микробной популяции (разность между начальной и итоговой численностью микробов, выраженная в процентах) при использовании смеси (DP_c) и при использовании чистого вещества (DP_a).

Графический метод. Данный метод основан на определении формы графика, который строится на основании данных, полученных в ходе использования предыдущего метода «шахматной доски». Данный график называется изоболограммой. Для реализации данного метода исследования используют показатель МВС. На осях графика откладываются значения, отражающие использованную дозу вещества для достижения половины максимального ЕС смеси (EC_{50}). Если график представлен прямой, вещества в смеси проявляют аддитивизм по отношению друг к другу; если вогнутой кривой — синергизм; если выпуклой кривой — антагонизм [28].

Функциональное взаимодействие в системе «метаболит–антибиотик». По аналогии с системой «метаболит–метаболит» в системе «метаболит–антибиотик»

Таблица 2. Распределение значений FIC по 4 принципам

FIC				Источник литературы
синергизм	аддитивизм	нейтрализм	антагонизм	
<1	1	1–2	>2	[30]
<0,5	0,5–1	1–4	>4	[32]
≤0,5	0,5–1	1–4	>4	[33]
<0,5	0,5–4	не определен	>4	[34]
≤0,5	0,5–1	не определен	>1	[35]
≤0,75	0,75–2	не определен	>2	[31]
<0,9	0,5–1,1	не определен	>1,1	[36]

Таблица 3. Распределение средних значений FIC по 4 принципам

Синергизм	Аддитивизм	Нейтрализм	Антагонизм	Расчёт показателей производился как среднее арифметическое данных табл. 2 для каждой колонки
<0,66	0,6–1,6	1–3,3	>2,6	

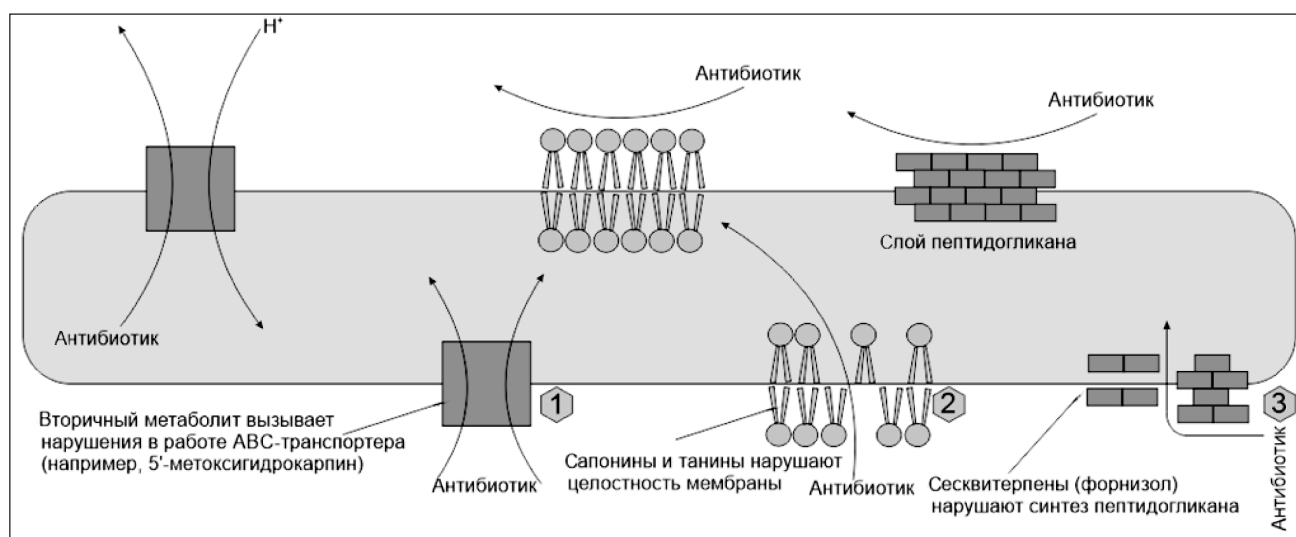


Рис. 8. Схема потенцирования действия антибиотиков вторичными метаболитами растений.

1 – нарушение работы efflux-насосов на примере ABC-транспортера; 2 – дезинтеграция компонентов ЦПМ сапонами и танинами; 3 – ингибирование синтеза пептидогликана клеточной стенки бактериальной клетки. При реализации данных механизмов облегчается проникновение/нарушается выведение молекул антибиотика.

лит–антибиотик» имеют место 4 типа функциональных взаимодействий, описанных выше (нейтрализм, аддитивизм, синергизм, антагонизм). Наиболее выгодны смеси антибиотиков и ВМР, компоненты которых вступают в синергизм по отношению друг к другу. Это позволяет теоретически многократно снизить такие показатели, как МИС (минимальная ингибирующая концентрация) и МВС (минимальная бактерицидная концентрация). В случае системы «метаболит–антибиотик» проявление отношений синергизма имеет право называться потенцированием действия препарата–антибиотика.

Благодаря реализации молекулярных механизмов противомикробного действия, описанных выше, ВМР способны облегчать прохождение молекул активного вещества в клетку (нарушение целостности клеточной мембраны) [6], задерживать его в клетке (блокирование эффлюкс-насосов) [3–5, 37], приостанавливать системы синтеза веществ-антагонистов для антибиотика (нарушение процессов транскрипции и трансляции) [6–10] и т. д.

Заключение

Таким образом, в процессе изучения литературы баз данных NCBI MedLine, Scopus, Embase, Elsevier были выделены основные механизмы антибактериального действия вторичных метаболитов растений, которые подразделяются на механизмы повреждения клеточной стенки и цитоплазматической мембраны бактерий, нарушения энергетического обмена и процессов метаболизма, а также синтеза ДНК.

Кроме того, обобщены принципы функциональных взаимодействий в системах «метаболит–метаболит» и «метаболит–антибиотик», позволяющих при необходимости использовать ВМР в сочетании друг с другом или с антибиотиком, что позволяет усиливать антимикробный эффект. Система «метаболит–антибиотик» требует более тщательного дальнейшего изучения, так как принцип её действия является возможным путём решения проблемы резистентности бактерий к антибиотикам и противомикробным химиотерапевтическим препаратам.

ЛИТЕРАТУРА

- Haven K. F. 100 greatest science discoveries of all time. Libraries Unlimited; 2007.
- Crozier A., Jaganath I. B., Clifford M. N. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. *Plant Second Metab Occur Struct Role Hum Diet* 2006; 1.
- Radulovic N. S., Blagojevic P. D., Stojanovic-Radic Z. Z., Stojanovic, N. M. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* 2013; 20: 932–952.
- González-Lamothe R. et al. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 3400–3419.
- Garvey M.I., Rahman M.M., Gibbons S., Piddock L.J.V. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. *Intern. J Antimicrob Agents* 2010; 37 (2): 145–151.
- Omojate Godstime C., Enwa Felix O., Jewo Augustina O., Eze Christopher O. Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens—a review. *J Pharm Chem Biol Sci* 2014; 2: 77–85.
- Paiva P. M. G., Gomes F. S., Napoleão Th. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* 2010; 396–406.
- Borges A., Ferreira C., Saavedra M. J., Simões M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb Drug Resist* 2013; 19: 256–265.
- Roger T., Pierre-Marie M., Igor V., Patrick V. Phytochemical screening and antibacterial activity of medicinal plants used to treat typhoid fever in Bamboutos division, West Cameroon. *J Appl Pharm Sci* 2015; 5 (06): 034–049.
- Rabinkov A., Miron T., Konstantinovski L., Wilchek M., Mirelman D., Weiner L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379 (2): 233–244.
- Stojanoski V. et al. Removal of the side chain at the active-site serine by a glycine substitution increases the stability of a wide range of serine β -lactamases by relieving steric strain. *Biochemistry (Mosc.)* 2016; 55: 2479–2490.
- Simões M., Bennett R. N., Rosa E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Nat Prod Rep* 2009; 26: 746.
- Suarez M., Haenni M., Canarelli S., Fisch F., Chodanowski P., Servis C., Michielin O., Freitag R., Moreillon P., Mermoud N. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3847–3857.
- Doughari J. H. Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. in *Phytochemicals—A global perspective of their role in nutrition and health* (InTech, 2012).
- Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 2018; 62.
- Григоренко В. Г., Рубцова М. Ю., Филатова Е. В., Андреева И. П., Мистрюкова Е. А., Егоров А. М. Клонирование, экспрессия гена металло-В-лактамазы NDM-1 и изучение каталитических свойств рекомбинантного фермента. *Вестник Московского Университета*. — 2016. — № 57. — С. 75–81. / Grigorenko V. G., Rubtsova M. Ju., Filatova E. V., Andreeva I. P., Mistrjukova E. A., Egorov A. M. Klonirovanie, ekspressiya gena metallo-B-laktamazy NDM-1 i izuchenie kataliticheskikh svoystv rekombinantnogo fermenta. *Vestnik Moskovskogo Universiteta* 2016; 57: 75–81. [in Russian]
- Fujita M., Shiota S., Kuroda T., Yoshida T., Mizushima T., Tsuchiya T. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and β -lactams against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immuno* 2005; 49, 391–396.
- Jing J., Zhang J.Y., Guo N., Sheng H., Li L., Liang J.C., Wang X.L., Li Y., Liu M.Y., Wu X.P., Yu L. Farnesol, a potential efflux pump inhibitor in *Mycobacterium smegmatis*, *molecules* 2010; 15: 7750–7762.
- Belofsky G., Percivall D., Lewis K., Tegos G., Ekart J. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria *J Nat Prod* 2004; 67: 481–484.
- Piddock L.J.V., Garvey M.I., Rahman M.M., Gibbons S. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65, 1215–1223.
- Musumeci R., Speciale A., Costanzo R., Annino A., Raqusa S., Rapisarda A., Pappalardo M.S., Lauk L. Berberis aetnensis C. Presl. Extracts?: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 48–53.
- Rouquette-Loughlin C. E. Dhulipala V., Reimche J. L., Raterman E., Begum A. A., Jerse A. E., Shafer W.M. cis- and trans-Acting Factors Influence Expression of the norM-Encoded Efflux Pump of *Neisseria gonorrhoeae* and Levels of Gonococcal Susceptibility to Substrate Antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62: e00821-18.
- Kwon Y.-I., Apostolidis E., Labbe R. G., Shetty K. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Phenolic Phytochemicals of Selected Clonal Herbs Species of Lamiaceae Family and Likely Mode of Action through Proline Oxidation. *Food Biotechnol* 2007; 21: 71–89.
- Jennings B.R., Ridler P.J. Interaction of chromosomal stains with DNA. An electrofluorescence study. *Biophys Struct Mech* 1983; 10: 71–79.
- Zhang Y.-M., Rock C.O. Evaluation of Epigallocatechin Gallate and Related Plant Polyphenols as Inhibitors of the FabG and FabI Reductases of Bacterial Type II Fatty-Acid Synthase. *J Biol Chem* 2004; 279: 30994–31001.
- Roccaro A.S., Blanco A.R., Giuliano F., Rusciano D., Enea V. Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular *Staphylococcal* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; 48: 1968–1973.
- Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 789–802.
- Bassolé I. H. N., Juliani H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012; 17: 3989–4006.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 453–462.
- Pei R.S., Zhou F., Ji B.P., Xu J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E.coli* with an improved Method. *J Food Sci* 2009; 74: 379–383.
- Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygodlo J., Demo M. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* 2009; 24: 348–354.
- Scholz A., Molnar J., Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 2006; 77: 279–285.
- Mulyaningsih S., Sporer F., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 2010; 17: 1061–1066.
- Zore G.B., Thakre A.D., Jadhav S., Karuppaiyil S.M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* 2011; 18: 1181–1190.
- Rosato A., Vitali, C., de Laurentis N., Armenise D., Nulillo M.A. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 2007; 14: 727–732.
- Romano C.S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A.A., Moreno S. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem* 2009; 115: 456–461.
- Kumar R., Pooja Patil S. J. A review on efflux pump inhibitors of gram-positive and gram-negative bacteria from plant sources. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2016; 5: 837–855.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Буданова Елена Вячеславовна — к. м. н., доцент кафедры Микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Горленко Кирилл Леонидович — студент Международной Школы «Медицина Будущего», ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Киселев Герман Юрьевич — студент Международной Школы «Медицина Будущего», ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Профилактика пневмоцистной пневмонии у пациентов с ревматическими заболеваниями: проблемы и поиск решений

Б. С. БЕЛОВ, Г. М. ТАРАСОВА, Д. С. БУХАНОВА

НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва

Prevention of Pneumocystic Pneumonia in Patients with Rheumatic Diseases: Problems and Solutions

B. S. BELOV, G. M. TARASOVA, D. S. BUKHANOVA

V. A. Nasonova Institute of rheumatology, Moscow

В настоящее время иммуносупрессивная терапия получает всё больше распространение в курации пациентов с системными ревматическими заболеваниями (РЗ). Однако активное применение иммуносупрессоров, в т.ч. генно-инженерных биологических препаратов сопровождается нарастанием оппортунистических инфекций. К числу последних относится пневмоцистная пневмония (ППн), которая представляет собой серьёзное осложнение со значимой летальностью у больных РЗ. Учитывая неоднородные данные о рисках, касающихся конкретных РЗ и той или иной иммуносупрессивной терапии, создание основанного на доказательных принципах всеобъемлющего руководства по профилактике ППн в ревматологии в настоящее время не представляется возможным. Определёнными ориентирами для практических врачей могут служить опубликованные разными авторскими коллективами алгоритмы профилактики ППн, которые, несомненно, подлежат дальнейшей доработке (или переработке) по мере накопления новых данных.

Ключевые слова: пневмоцистная пневмония, ревматические заболевания, глюкокортикоиды, цитостатики, ко-тримоксазол, профилактика.

Currently, immunosuppressive therapy is becoming increasingly common in the curation of patients with systemic rheumatic diseases (RH). However, the active use of immunosuppressors, including genetically engineered biological drugs is accompanied by an increase in opportunistic infections. The latter include pneumocystic pneumonia (PPn), which is a serious complication with significant mortality in patients with RA. Taking into account the heterogeneous risk data for specific RS and a particular immunosuppressive therapy, the establishment of evidence-based comprehensive guidelines for the prevention of PPn in rheumatology is not currently possible. Some guidelines for practicing physicians, published different collectives, can serve algorithms for the prevention of PPn, which will no doubt be further refined (or processed) the accumulation of new data.

Keywords: pneumocystic pneumonia, rheumatic diseases, glucocorticoids, cytostatics, co-trimoxazole, prevention.

Введение

Pneumocystis carinii — микроорганизм, который впервые был описан в 1909 г. К. Шагасом и выделен в отдельный вид в 1912 г. Ф. Деланое. В 1942 г. было установлено клиническое значение данного возбудителя, а именно показана его роль в возникновении вспышек интерстициальной плазмоцитарной пневмонии, которые наблюдали у недоношенных новорождённых и детей с иммунодефицитными состояниями. В дальнейшем доказана принадлежность данного микроорганизма к грибам. В 1994 г. возбудитель пневмоцистоза человека получил название *P.jiroveci* — по фамилии чешского учёного-паразитолога Отто Йиро-

вица, впервые описавшего этот микроорганизм как причину лёгочного заболевания у людей [1].

Начиная с 1980 гг. в связи с повсеместным распространением ВИЧ-инфекции клиническая значимость этого возбудителя чрезвычайно возросла, а пневмоцистная пневмония (ППн) была официально признана СПИД-ассоциированным заболеванием [2]. Внедрение в практику антиретровирусных препаратов и триметоприм-сульфаметоксазола (ко-тримоксазола), ставшего средством выбора для лечения и профилактики ППн, привело к значительному снижению частоты последней в ВИЧ-инфицированной популяции. Наряду с этим встречаемость ППн стала нарастать у больных с медикаментозной иммуносупрессией без ВИЧ-инфекции. В эту же категорию вошли пациенты с системными ревматическими заболеваниями (РЗ), получающие те-

© Коллектив авторов, 2019

Адрес для корреспонденции: 115522 Москва, Каширское шоссе, 34А. НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой

рапию глюкокортикоидами (ГК), цитотоксиками и генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП).

Для ВИЧ-инфицированных больных, а также для пациентов, страдающих гематологическими заболеваниями и реципиентов трансплантированных органов, на сегодняшний день имеются общепринятые методические рекомендации по профилактике ППн. В то же время для больных с системными РЗ в целом международные согласительные рекомендации отсутствуют, несмотря на высокую летальность от ППн среди данной категории пациентов (45,7%) [3]. Как показали опросы практических ревматологов, по проблеме профилактики ППн при РЗ существует широкое разнообразие точек зрения (нередко — прямо противоположных) [4, 5]. Цель настоящей статьи — анализ данных литературы последних лет по проблеме профилактики ППн у больных РЗ.

Трудности в подготовке рекомендаций

Многие авторы отмечают ряд проблем в подготовке унифицированных рекомендаций по профилактике ППн для системных РЗ. Во-первых, с учётом низкой встречаемости ППн в этой популяции абсолютное число случаев рассматриваемой патологии будет не велико. Во-вторых, имеет место значительная вариабельность частоты ППн среди пациентов с системными РЗ. Метаанализ, включавший 11905 больных РЗ, показал следующие данные по частоте развития ППн: гранулематозный полиангиит (ГПА) — 12%, дерматомиозит/полимиозит (ДМ/ПМ) — 6%, системная красная волчанка (СКВ) — 5%, ревматоидный артрит (РА) — 1%. Для больных ГПА необходимость лечения в стационаре по поводу ППн также была максимальной — 89 случаев на 10000 госпитализаций в год. Для других РЗ показатели были следующими: узелковый полиартериит (УП) — 65, воспалительные миопатии — 27, СКВ-12, системная склеродермия (ССД) — 8, РА-2 [3]. По данным американских авторов, назначение профилактики целесообразно только у тех категорий пациентов, где риск развития ППн равен или превышает 3,5% [6]. Следовательно, рекомендации по профилактике ППн должны быть прописаны для каждого РЗ в отдельности.

Факторы риска инфекции

Разработка руководства по профилактике была бы в значительной степени облегчена при определении факторов риска развития ППн у больных системными РЗ. Однако гетерогенность таких популяций представляет собой существенное препятствие в выполнении подобного исследования, поскольку свой вклад в развитие инфекции вносят как патофизиология самого РЗ (в т. ч. фо-

новый аберрантный иммунитет), так и иммуносупрессивные препараты, применяемые для лечения этих болезней.

Уровень CD4+ лимфоцитов, составляющий менее 200 клеток/мкл, является значимым фактором риска в популяции больных СПИДом [7]. Однако значимость подобного уровня при системных РЗ не подтверждена достаточным количеством данных. Более того, все исследования, посвящённые этому вопросу, были ретроспективными. Так, анализ данных больных без ВИЧ-инфекции, но с высоким риском ППн, показал, что уровни CD4+ лимфоцитов <250 клеток/мкл наблюдались во всех случаях (8 пациентов), при которых развилась ППн на фоне различных аутоиммунных заболеваний. При этом в 6 случаях содержание CD4+ лимфоцитов составило <200 клеток/мкл [8]. В ретроспективном исследовании J. Li и соавт. у всех больных с системными РЗ, у которых развилась ППн, содержание CD4+ лимфоцитов было <250 клеток/мкл (87 ± 78) [9]. Следует отметить, что сопоставления рассматриваемого параметра с таковым у больных с системными РЗ без ППн в обеих указанных работах не проведены. Более того, в ретроспективном исследовании французских авторов [10] показано, что медиана содержания CD4+ лимфоцитов у больных аутоиммунными заболеваниями и ППн составила 302/мкл, причём у половины этих пациентов данный показатель превышал 300/мкл. Таким образом, значимость данного маркера в инициации профилактики ППн у больных системными РЗ должна быть подтверждена в дальнейших, желательно — проспективных сравнительных исследованиях.

Ряд авторов обращают внимание на снижение абсолютного числа лимфоцитов у больных системными РЗ перед развитием у них ППн [3, 9, 11–14]. Однако до сих пор дебатировался контрольная «точка отсечения» уровня лимфоцитов, свидетельствующая о необходимости начала профилактики. В ретроспективном исследовании, включавшем 44 больных с ГПА (из них 12 — с ППн), которые получали ГК и цитостатики, фактором риска развития ППн была лимфопения, имевшая место как исходно (≤ 800 клеток/мл, $p=0,018$), так и через 3 мес. от начала иммуносупрессивной терапии (≤ 600 клеток/мл, $p=0,014$) [15]. Число лимфоцитов <500/мл расценивалось как независимый фактор риска ППн (ОР 12,4; 95% ДИ 1,07–14,4, $p=0,044$) в гетерогенной группе больных с системными РЗ, которые получали преднизолон в суточной дозе ≥ 30 мг, [16]. В исследовании A. Porges и соавт. ППн наблюдалась в 66% случаев при снижении числа лимфоцитов <350/мл среди больных СКВ, получавших ГК и цитостатики [17].

Иммуносупрессивные препараты, применяемые для лечения системных РЗ, в настоящее вре-

мя рассматриваются в качестве факторов риска различных инфекций, включая оппортунистические, подобные ППн. Однако в отношении ГК, как наиболее часто применяемых препаратов, по-прежнему ведутся дискуссии о том, какая все-таки доза повышает риск ППн — средняя, суточная, пульсовая или кумулятивная [11, 18, 19]. В зависимости от категории больных суточная доза ГК в преднизолоновом эквиваленте способствующая развитию ППн, колеблется от >15 мг до >40 мг [2, 16, 20–22]. По данным клиники Мейо, доза 30 мг/сут (в пересчёте на преднизолон) рассматривается как ключевой фактор риска ППн. В то же время среди пациентов с ППн суточная доза ГК составляла 16 мг в 25% случаев [23]. К тому же при некоторых РЗ, в частности гигантоклеточном височном артериите Гортон, несмотря на продолжительную терапию высокими дозами ГК, частота ППн остаётся крайне низкой [24]. Таким образом, сам факт применения ГК, по-видимому, не определяет полностью риск развития ППн, однако терапия этими препаратами может повышать частоту данной инфекции в некоторых популяциях больных РЗ.

Общеизвестен факт инициации коморбидных инфекций при лечении цитостатическими препаратами, в т.ч. применяемыми в ревматологии. В частности, показана повышенная частота ППн, развивавшейся при больших кумулятивных дозах циклофосфамида (ЦФ), у больных ГПА [25]. В другом исследовании на аналогичной категории больных пациенты с ППн также получали более высокие кумулятивные дозы ЦФ, однако это обстоятельство не было зафиксировано в качестве значимого фактора риска [15]. Несмотря на то, что применение цитотоксиков как группы в целом в течение первых двух недель от начала ГК-терапии значимо ($p=0,011$) повышало риск ППн, между отдельными препаратами (ЦФ, метотрексат, азатиоприн) различия не выявлены [16].

Крайне низкая частота ППн (или отсутствие таковой) у больных с системными РЗ, получающих ЦФ без ГК, ставят под сомнение данный препарат в качестве определённого фактора риска рассматриваемой инфекции [26]. Отмечено развитие ППн при лечении генно-инженерными биологическими препаратами [27, 28]. На сегодняшний день недостаточно оснований для того, чтобы назначать профилактику ППн, принимая во внимание лечение только каким-то конкретным препаратом [29].

Летальность

Среди пациентов с системными РЗ летальность, обусловленная ППн, достаточно высока, особенно при сопоставлении с ВИЧ-инфицированными. В зависимости от популяции больных показатели летальности колеблются от 9 до 85%

[9, 30]. Однако определение истинной причины нарастающей летальности (т. н. атрибутивной летальности) затруднено во многом из-за патофизиологического полиморфизма фонового РЗ и разнообразия иммуносупрессивной терапии. Интерпретацию показателей летальности при ППн ещё более осложняет высокая частота иных коморбидных оппортунистических инфекций, включая цитомегаловирус, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и др. [9, 31]. Среди прочих факторов риска летального исхода при ППн называют пожилой возраст, мужской пол, сниженное содержание кислорода во вдыхаемом воздухе, необходимость механической вентиляции лёгких, снижение содержания сывороточного альбумина [3, 13]. В целом определённые факторы риска летальности, ассоциированной с ППн, у больных системными РЗ не установлены. По всей вероятности, большее число коморбидных заболеваний (в т.ч. иные оппортунистические инфекции) могут быть причиной более высокой летальности от ППн при системных РЗ, по сравнению с ВИЧ-инфицированными.

Препараты для профилактики ППн

Профилактическое назначение сульфаметоксазол-триметоприма (ко-тримоксазола) у больных ВИЧ-инфекцией, а также у пациентов клиник трансплантологии и гемобластозов привело к существенному снижению частоты как самого пневмоцистоза, так и летальных исходов, обусловленных данной инфекцией. Среди пациентов с системными РЗ рандомизированные контролируемые исследования по профилактике ППн не проводили. В ретроспективной работе, включавшей 132 больных с воспалительными РЗ (СКВ, ДМ, болезнь Бехчета, васкулит), профилактика ко-тримоксазолом привела к снижению абсолютного риска развития ППн на 7,3% [32]. В других ретроспективных исследованиях наблюдали подобное снижение риска [16, 20]. В то же время профилактическое назначение ко-тримоксазола у больных с ВИЧ-инфекцией и без таковой ассоциируется с широким спектром нежелательных реакций (НР), которые могут быть серьёзными и даже угрожающими жизни. НР включали тошноту, диарею, реакции гиперчувствительности (сыпь, лихорадка), повышение уровней креатинина и трансаминаз, лейкопению, редко — такие тяжёлые иммуноопосредованные реакции, как синдром Стивенса–Джонсона и асептический менингит. Частота НР при профилактическом применении ко-тримоксазола у больных с системными РЗ составляла 8,5–20% [32, 33]. В абсолютном большинстве случаев НР претерпевали полное обратное развитие после отмены препарата. Подчёркивается, что при назначении ко-тримоксазола пациентам с РЗ, принимающим метот-

рексат, могут наблюдаться цитопенические реакции, вплоть до выраженной супрессии костного мозга, поскольку оба этих препарата ингибируют дигидрофолатредуктазу [34].

При непереносимости ко-тримоксазола альтернативой для профилактики ППн могут служить дапсон, пентамидин, атоваквон, примахин в сочетании с клиндамицином, но эффективность и переносимость этих препаратов у больных РЗ не изучена.

Профилактика ППн при отдельных РЗ

Васкулиты. Наиболее весомые данные, обуславливающие необходимость профилактики ППн, получены у больных ГПА. Частота ППн при ГПА составляет 60—120 случаев на 10000 пациенто-лет [15, 30]. По данным метаанализа, включавшего 529 больных ГПА, ППн развивалась в 125 случаев, из которых в 47% наблюдали летальный исход [19]. УП также относят к РЗ с высоким риском развития ППн (ОР 18,3; 95% ДИ 4,9—63,4) [35]. Имеются отдельные сообщения о развитии ППн у больных микроскопическим полиангиитом [9, 36].

В работе французских учёных, изучавших эффективность и переносимость различных схем применения ЦФ у больных ГПА, ППн развивалась у 10 (20%) из 50 больных. Учитывая высокую частоту ППн в течение первых 12 мес. лечения, в дальнейшем в протокол исследования было включено применение ко-тримоксазола с профилактической целью [25]. При назначении ритуксимаба (РТМ) и ЦФ в плане индукционной терапии у больных ANCA-ассоциированным васкулитом (ANCA-AB) с поражением почек развития ППн не наблюдали ни в одном случае [37]. В ходе продолженной части сходного по дизайну исследования, где все пациенты ($n=197$) получали профилактику ко-тримоксазолом, ППн развивалась только у 1 больного, что связывают с низкой комплаентностью [38]. В исследовании, включавшем 115 больных ANCA-AB, которые получали РТМ или азатиоприн в режиме поддерживающей терапии, профилактику ко-тримоксазолом назначали пациентам с количеством $CD4+<250$ /мл. ППн развивалась только в 1 случае [39]. Анализ инфекционных осложнений, возникавших при лечении ANCA-AB, показал, что профилактика ППн в период индукционной терапии необходима всем пациентам до тех пор, пока суточная доза ГК превышает 10 мг, а количество $CD4+<300$ /мл [40]. Профилактика ППн с помощью ко-тримоксазола (800/160 мг через день или 400/80 мг ежедневно) рекомендуется экспертами Европейской Антиревматической Лиги (EULAR) для всех больных с ANCA-AB, получающих терапию ЦФ при отсут-

ствии противопоказаний [41]. С помощью фармакоэкономического анализа профилактики ко-тримоксазолом у больных ГПА продемонстрировано увеличение числа лет, скорректированных по качеству жизни (QALY) и экономию расходов более чем на 1000\$ [42].

По мнению ряда авторов, необходимость профилактики ППн у больных ГПА на протяжении индукционной терапии ЦФ и/или РТМ сомнений не вызывает [28, 43]. В то же время по данным британских исследователей, развитие ППн у больных ANCA-AB возможно на более поздних сроках болезни, особенно при усилении иммуносупрессивной терапии на фоне сопутствующей лимфопении. В связи с этим требуются дальнейшие наблюдательные исследования (желательно с привлечением данных регистров) с целью стратификации риска поздней ППн и профилактической тактики в отношении последней у этих пациентов [44].

Системная красная волчанка. Большинство больных СКВ, получающих ГК в высоких дозах или цитостатические препараты, имеют повышенную восприимчивость к инфекциям. Однако из 76156 больных СКВ, получавших лечение ЦФ, диагностирован только 121 случай ППн, что составило 15,88 на 10000 пациентов [5]. По данным других исследований, частота ППн у больных СКВ, получающих цитостатическую терапию, также остаётся достаточно низкой. Обращает на себя внимание повышенная встречаемость НР у больных СКВ при приёме сульфаниламидных препаратов. Так, в исследовании «случай—контроль» возникновение аллергических реакций, наиболее частой из которых была кожная сыпь, отмечали у 31% больных СКВ при приёме сульфаниламидов. Среди этих пациентов в 21% случаев наблюдали обострение основного заболевания [45]. Констатируется значимо большая частота НР у больных СКВ при лечении сульфаниламидами, по сравнению с таковой у пациентов с воспалительными заболеваниями суставов (52 и 19%, соответственно, $p<0,003$) [46]. По данным ретроспективного анализа медицинской документации 312 больных с системными РЗ, получавших профилактику по поводу ППн, отмечено преобладание НР в группе больных СКВ (11%) по сравнению с пациентами, страдавшими различными заболеваниями лёгких (2,67%). При этом позитивность по антителам к рибонуклеопротеиду расценена как значимый фактор риска НР (ОШ 5,8; 95% ДИ 1,5—24,9, $p=0,01$) [47].

С учётом низкой встречаемости ППн у больных СКВ даже при лечении цитостатиками, имеется недостаточно доказательств в пользу всеобщего применения ко-тримоксазола в качестве превентивного средства, принимая во внимание высокую частоту НР со стороны последнего при данной патологии.

Таблица 1. Частота ППн при воспалительных заболеваниях суставов ([48], в модификации)

Страна, период времени	Длительность катамнеза, пациенто-лет	Частота ППн, на 1000 пациенто-лет	Библиографический источник
Сев. Америка, 1999—2010	17712	< 0,01	[49]
США, 1998—2007	28493	0,56	[50]
Великобритания, 2001—2005	9868	0	[51]
США, 2001—2006	15047	0,14	[52]
Франция, 2004—2007	57711	0,087	[53]
Япония, 2003—2004	2500	8,8	[54]
Япония, 2005—2006	3272	4,6	[55]
Япония, 2003—2008	582	5	[56]
США, 200—2005	1765	0,07	[57]

Воспалительные миопатии. При воспалительных миопатиях, включающих ДМ и ПМ, ППн встречается реже, чем при ГПА, но более часто, чем при СКВ. Частота её составляет 6% или 20 случаев на 10000 пациенто-лет [15, 19]. Летальность от ППн в данной группе больных колеблется от 33 до 56% [9, 11, 13, 14, 19]. Факторы риска летальности от пневмоцистоза при ДМ/ПМ не определены. Для этих РЗ рекомендуется индивидуальный подход при решении вопроса о профилактике ППн с учётом дозы ГК, уровня лимфопении и количества CD4+.

Воспалительные заболевания суставов. В табл. 1 представлены данные о частоте ППн среди больных с воспалительными заболеваниями суставов (в абсолютном большинстве случаев — РА).

Примечательны выраженные различия в частоте ППн в Европейской и Североамериканской когортах больных, с одной стороны, и в работах японских авторов — с другой. Частота ППн была крайне низкой на протяжении 3-летнего проспективного наблюдения за больными, включёнными во французский регистр RATIO и получавшими ингибиторы фактора некроза опухоли- α (иФНО- α) по поводу болезни Крона и различных воспалительных заболеваний суставов (РА, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит) [53]. Другими исследователями в Европе и США были получены аналогичные данные [50—52, 55]. В то же время в исследованиях, выполненных в Японии, частота ППн была достаточно высокой, в связи с чем авторами предложены различные схемы профилактики данной инфекции [54—56, 58]. По инициативе национального Института здоровья (США) было выполнено ретроспективное исследование с анализом базы данных всех госпитализированных пациентов с РА, проживавших в штате Калифорния в течение 10 лет. Скорректированные по полу и возрасту ежегодные показатели частот ППн у больных РА колебались от 0,6 до 4 случаев на 100000 пациенто-лет [59]. Сходные результаты были получены в ретроспективном когортном исследовании, выполненном в США J. Baddley и соавт. Среди 33324 больных, получавших иФНО- α по поводу различных воспалительных заболеваний суставов, ППн диагностирована

лишь в 16 (0,05%) случаях. При этом встречаемость ППн у больных РА, получавших иФНО- α , не отличалась от таковой среди пациентов, находившихся на лечении БПВП — 0,056 и 0,051 на 10000 пациенто-лет, соответственно [47]. По данным крупного метаанализа, включавшего более 30000 больных РА, ППн имела место в 8 случаях, при этом значимой ассоциации её развития с применением ГИБП не выявлено [60].

Таким образом, в настоящее время большинством экспертов не поддерживается необходимость рутинного назначения профилактики ППн у всех больных РА и другими воспалительными заболеваниями суставов, в т.ч. при лечении ГИБП.

Системная склеродермия. В литературе имеется очень мало данных о роли профилактики ППн при системной склеродермии (ССД). В одной серии наблюдений частота ППн у больных ССД составила 8 случаев на 10000 госпитализаций в год [3]. В другом исследовании, включавшем 117 больных ССД, на протяжении всего катамнестического периода, составившего 310 пациенто-лет, случаев ППн не наблюдали [61]. В крупном рандомизированном контролируемом исследовании (Scleroderma Lung Study) о частоте ППн не сообщалось [62].

Рекомендации

Как показано выше, лимфопения, низкое содержание CD4+ лимфоцитов и иммуносупрессия вносят свой вклад в развитие инфекционных осложнений. Рядом авторов были представлены рекомендации по профилактике ППн с учётом вышеназванных факторов. Так, E. Sowden и соавт. предложили ориентироваться на количество CD4+ клеток спустя 1 мес. иммуносупрессивной терапии у больных, удовлетворяющих следующим критериям: 1) суточная доза ГК > 15 мг в преднизолоновом эквиваленте; 2) длительность ГК-терапии более 3 мес.; 3) лимфопения < 600 клеток/мл. Профилактика рекомендуется при количестве CD4+ < 200/мл, если больной относится к одной из групп риска, в которой ежегодная частота ППн превышает 9% [8]. По мнению Y. Zhang и соавт., профилактика ППн показана

Таблица 2. Рекомендации по профилактике ППн у больных системными РЗ ([29], в модификации)

Заболевание	Профилактика	Кому назначается	Особые факторы
ГПА	Да	Все больные в период индукционной терапии	Нет
СКВ	Условно ¹	Высокие дозы ГК	Лимфопения ² Низкое количество CD4 ⁺ ³ Иммуносупрессивные схемы терапии
ПМ/ДМ	Условно ¹	Высокие дозы ГК	Лимфопения ² Низкое количество CD4 ⁺ ⁴ Тяжёлые формы болезни
УП, ANCA-AB	Условно ¹	Индукционная терапия и/или высокие дозы ГК	Лимфопения ² Низкое количество CD4 ⁺ ⁴
РА	Нет		
ГКА	Нет		
ССД	Нет		

Примечание. ¹ – Рекомендация «условно» означает, что существует недостаточно доказательств для широкого применения, поэтому вопрос о профилактике решается в индивидуальном порядке, принимая во внимание вышеуказанные особые факторы; ² – при содержании лимфоцитов <500 клеток/мл; ³ – при содержании CD4⁺ <350 клеток/мл; ⁴ – при содержании CD4⁺ <200 клеток/мл. ГКА – гигантоклеточный артериит.

Таблица 3. Профилактика ППн при лечении ГК [64]

Нозология	Профилактика в зависимости от суточной дозы ГК ¹		Прекращение профилактики при суточной дозе ГК <15 мг
	15–30 мг	>30 мг	
ГПА	Да	Да	Да ²
Микроскопический полиангиит	Да	Да	Да ²
ССД	Да ³	Да	Да
ДМ/ПМ	Да ³	Да	Да
СКВ	Нет	Да	Да
РА	Нет	Да	Да

Примечание. ¹ – Учитывается длительное применение ГК (>4 недель); ² – при наличии <2 дополнительных факторов риска на момент прекращения: исходная лимфопения, низкое количество CD4⁺, применение циклофосфамида, иФНО- α или ритуксимаба, начальная доза ГК >60 мг; ³ – при наличии, по крайней мере, одного дополнительного фактора риска: исходная лимфопения, низкое количество CD4⁺, применение циклофосфамида, иФНО- α или ритуксимаба, начальная доза ГК >60 мг.

всем больным системными РЗ, получающим иммуносупрессивную терапию или таковой с ППн в анамнезе [36]. M. Demouelle и соавт. рекомендуют назначать профилактику ППн больным системными РЗ при наличии 2 или более факторов из следующих: 1) применение ГК в дозе ≥ 20 мг/сут. более 4 недель; 2) применение ≥ 2 болезнь-модифицирующих противоревматических препаратов; 3) число лимфоцитов ≤ 350 клеток/мл или наличие фонового паренхиматозного заболевания лёгких [26].

В табл. 2 представлены рекомендации американских авторов, которые предлагают не назначать профилактику ППн больным РА, ГКА и ССД.

В то же время в рекомендациях, подготовленных экспертами группы ISMIR (Italian group for the Study and Management of Infections in patients with Rheumatic diseases), профилактика ППн показана всем больным РА с количеством CD4⁺ клеток <200/мкл или числом лимфоцитов <500/мкл с обязательным тщательным мониторингом нежелательных лекарственных реакций. Кроме того, больные РА, имеющие 3 и более факторов риска (возраст старше 65 лет, число лимфоцитов >500/мкл, но <1500/мкл, приём иммунодепрессантов и/или ГК > 3 мес., применение ГИБП в анамнезе, сопутствующие заболевания лёгких, снижение содержания сывороточно-

го альбумина или IgG) заслуживают особого внимания и рассматриваются в качестве кандидатов для первичной профилактики ППн в индивидуальном порядке [63].

С учётом результатов крупного наблюдательного исследования [22], в 2018 г. K. Winthrop и J. Baddley предложили алгоритм профилактики ППн в зависимости от нозологии, дозы и длительности приёма ГК (табл. 3). Поскольку эти рекомендации основаны на ограниченных данных и мнении экспертов, авторы подчеркивают, что они являются сторонниками проведения дальнейших исследований в данной области [64].

Заключение

ППн представляет собой серьёзное осложнение со значимой летальностью у больных РЗ. Однако отсутствие доказательных данных и, как следствие, согласованного руководства затрудняет эффективное внедрение профилактики ППн в клиническую практику у этих пациентов. Определёнными ориентирами для практических врачей могут служить упоминавшиеся выше алгоритмы профилактики ППн. Однако эти алгоритмы, несомненно, не бесспорны, они требуют обсуждения и подлежат дальнейшей доработке (или переработке) по мере накопления новых данных в области профилактики ППн у больных РЗ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пневмоцистоз — актуальная иммунодефицит-ассоциированная инфекция (эпидемиология, клиника, диагностика и лечение): Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010; 31. / Pnevmoistsioz — aktual'naya immunodefitsit-assotsirovannaya infektsiya (epidemiologiya, klinika, diagnostika i lechenie): Metodicheskie rekomendatsii. M.: Federal'nyj tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2010. — 31 s. [in Russian]
2. Centers for Disease Control and Prevention: Pneumocystis pneumonia. Данные на сайте ://www.cdc.gov/fungal/diseases/pneumocystispneumonia. Дата обращения: 25 мая 2019 г.
3. Ward M.M., Donald F. Pneumocystis carinii pneumonia in patients with connective tissue diseases: the role of hospital experience in diagnosis and mortality. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (4): 780—789.
4. Cettomai D., Gelber A.C., Christopher-Stine L. A survey of rheumatologists' practice for prescribing pneumocystis prophylaxis. *J Rheumatol* 2010; 37 (4): 792—799.
5. Gupta D., Zachariah A., Roppelt H. et al. Prophylactic antibiotic usage for pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with systemic lupus erythematosus on cyclophosphamide: a survey of US rheumatologist and the review of literature. *J Clin Rheumatol* 2008; 14: 267—272.
6. Green H., Paul M., Vidal L., Leibovici L. Prophylaxis of Pneumocystis pneumonia in immunocompromised non-HIV-infected patients: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin Proc* 2007; 82 (9): 1052—1059.
7. Мазус А.И., Каминский Г.Д., Зимица В.Н. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ВИЧ-инфекции. 2-е изд., испр. доп. М.: 2014. — 75 с. / Mazus A.I., Kaminskij G.D., Zimica V.N. et al. Natsional'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu VICH-infektsii. 2-e izd., ispr. dop. M.: 2014; 75. [in Russian]
8. Sowden E., Carmichael A.J. Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and pneumocystis pneumonia: a strategy for prevention. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 42. doi:10.1186/1471-2334-4-42.
9. Li J., Huang X.M., Fang W.G. et al. Pneumocystis carinii pneumonia in patients with connective tissue disease. *J Clin Rheumatol* 2006; 12 (3): 114—117.
10. Baulier G., Issa N., Gabriel F. et al. Guidelines for prophylaxis of Pneumocystis pneumonia cannot rely solely on CD4-cell count in autoimmune and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2018; 36 (3): 490—493.
11. Marie L., Hachulla E., Cherin P. et al. Opportunistic infections in polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2005; 53 (2): 155—165.
12. Kadoya A., Okada J., Iikuni Y. et al. Risk factors for pneumocystis carinii pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis or systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23 (7): 1186—1188.
13. Chen M., Tian X., Qin F. et al. Pneumocystis pneumonia in patients with autoimmune disease: a retrospective study focused on clinical characteristics and prognostic factors related to death. *PLoS One* 2015; 10 (9): e0139144. doi:10.1371/journal.pone.0139144.
14. Teichtahl A.J., Morrisroe K., Cicciello S. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in connective tissue diseases: comparison with other immunocompromised patients. *Semin Arthritis Rheum* 2015; 45: 86—90.
15. Godeau B., Mainardi J.L., Roudot-Thoraval F. et al. Factors associated with pneumocystis carinii pneumonia in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 991—994.
16. Ogawa J., Harigai M., Nagasaka K. et al. Prediction of and prophylaxis against pneumocystis pneumonia in patients with connective tissue diseases undergoing medium- or high-dose corticosteroid therapy. *Mod Rheumatol* 2005; 15: 91—96.
17. Porges A.J., Beattie S.L. et al. Patients with systemic lupus erythematosus at risk for pneumocystis carinii pneumonia. *J Rheumatol* 1992; 19: 1191—1194.
18. Mansharamani N.G., Balachandran D. et al. Peripheral blood CD4 + T-lymphocyte counts during pneumocystis carinii pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest* 2000; 118 (3): 712—720.
19. Falagas M.E., Manta K.G., Betsi G.I. et al. Infection-related morbidity and mortality in patients with connective tissue diseases: a systemic review. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 663—670.
20. Okada J., Kadoya A., Rana M. et al. Efficacy of sulfamethoxazole-trimethoprim administration in the prevention of pneumocystis carinii pneumonia in patients with connective tissue disease. *Kansenshogaku Zasshi* 1999; 73 (11): 1123—1129.
21. Mecoli C.A., Saylor D., Gelber A.C. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in rheumatic disease: a 20-year single-centre experience. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35 (4): 671—673.
22. Park J.W., Curtis J.R., Moon J. et al. Prophylactic effect of trimethoprim-sulfamethoxazole for pneumocystis pneumonia in patients with rheumatic diseases exposed to prolonged high-dose glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 2018; 77 (5): 644—649.
23. Yale S.H., Limper A.H. Pneumocystis carinii pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc* 1996; 71 (1): 5—13.
24. Kermani T.A., Ytterberg S.R., Warrington K.J. Pneumocystis jirovecii pneumonia in giant cell arteritis: a case series. *Arthritis Care Res* 2011; 63 (5): 761—765.
25. Guillevin L., Cordier J.F., Lhote F. et al. A prospective, multicenter, randomized trial comparing steroids and pulse cyclophosphamide versus steroids and oral cyclophosphamide in the treatment of generalized Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (12): 2187—2198.
26. Demoruelle M.K., Kahr A., Verilhac K. et al. Recent-onset systemic lupus erythematosus complicated by acute respiratory failure. *Arthritis Care Res* 2013; 65 (2): 314—323.
27. Kaur N., Mahl T.C. Pneumocystis jirovecii (carinii) pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. *Dig Dis Sci* 2007 Jun; 52 (6): 1481—1484.
28. Teichmann L.L., Woenckhaus M., Vogel C. et al. Fatal Pneumocystis pneumonia following rituximab administration for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008; 47 (8): 1256—1257.
29. Wolfe R.M., Peacock J.E. Pneumocystis Pneumonia and the Rheumatologist: Which Patients Are At Risk and How Can PCP Be Prevented? *Curr Rheumatol Rep* 2017; 19 (6): 35.
30. Ognibene F.P., Shelhamer J.H., Hoffman G.S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia: a major complication of immunosuppressive therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 795—799.
31. Godeau B., Coutant-Perronne V., Huang D.L.T. et al. Pneumocystis carinii pneumonia in the course of connective tissue disease: report of 34 cases. *J Rheumatol* 1994; 21 (2): 246—251.
32. Vananuvat P., Suwannalai P., Sungkanupapong S. et al. Primary prophylaxis for pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with connective tissue diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2011; 41: 497—502.
33. Zycinska K., Wardyn K.A., Zielonka T.M. et al. Co-trimoxazole and prevention of relapses of PR3-ANCA positive vasculitis with pulmonary involvement. *Eur J Med Res* 2009; 14: 265—267.
34. Bourre-Tessier J., Haraoui B. Methotrexate drug interactions in the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 2010; 37 (7): 1416—1421.
35. Fillatre P., Decaux O., Jouneau S. et al. Incidence of Pneumocystis jirovecii pneumonia among groups at risk in HIV-negative patients. *Am J Med* 2014; 127 (12): 1242. e11-7.
36. Zhang Y., Zheng Y. Pneumocystis jirovecii pneumonia in mycophenolate mofetil-treated patients with connective tissue disease: analysis of 17 cases. *Rheumatol Int* 2014; 34: 1765—1771.
37. Jones R.B., Tervaert J.W.C., Hauser T. et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 2010; 363: 211—220.
38. Specks U., Merkel P.A., Seo P. et al. Efficacy of remission-induction regimens for ANCA-associated vasculitis. *New Engl J Med* 2013; 369 (5): 417—427.
39. Guillevin L., Pagnoux C., Karras A. et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *New Engl J Med* 2014; 371 (19): 1771—1780.
40. Kronbichler A., Jayne D.R.W., Mayer G. Frequency, risk factors and prophylaxis of infection in ANCA-associated vasculitis. *Eur J Clin Invest* 2015; 45 (3): 346—368.
41. Yates M., Watts R.A., Bajema I.M. et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 1583—1594.
42. Chung J.B., Armstrong K., Schwartz S. et al. Cost-effectiveness of prophylaxis against pneumocystis carinii pneumonia in patients with Wegener's granulomatosis undergoing immunosuppressive therapy. *Arthritis Rheum* 2000; 43 (8): 1841—1848.
43. King C., Harper L., Little M. The complications of vasculitis and its treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018 Feb; 32 (1): 125—136.
44. Metraiah E.H., Matraiah E.H., Olisaka N. et al. Late-onset Pneumocystis jirovecii pneumonia (PJP) in patients with ANCA-associated vasculitis. *Clin Rheumatol* 2018 Jul; 37 (7): 1991—1996.

45. Petri M., Allbritton J. Antibiotic allergy in systemic lupus erythematosus: a case-control study. *J Rheumatol* 1992; 19 (2): 265–269.
46. Pope J., Jerome D., Fenlon D. et al. Frequency of adverse drug reactions in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2003; 30: 480–484.
47. Maezawa R., Kurasawa K., Arai S. et al. Positivity for anti-RNP antibody is a risk factor for adverse effects caused by trimethoprim- sulfamethoxazole, a prophylactic agent for *P. jirovecii* pneumonia, in patients with connective tissue diseases. *Mod Rheumatol* 2013; 23: 62–70.
48. Grubbs J.A., Baddley J.W. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients receiving tumor-necrosis-factor-inhibitor therapy: implications for chemoprophylaxis. *Curr Rheumatol Rep* 2014; 16 (10): 445. doi: 10.1007/s11926-014-0445-4
49. Lichtenstein G.R., Feagan B.G., Cohen R.D. et al. Serious infection and mortality in patients with Crohn's disease: more than 5 years of follow-up in the TREAT™ registry. *Am J Gastroenterol* 2012; 107 (9): 1409–1422.
50. Baddley J.W., Winthrop K.L., Chen L. et al. Non-viral opportunistic infections in new users of tumour necrosis factor inhibitor therapy: results of the SAfety Assessment of Biologic ThERapy (SABER) study. *Ann Rheum Dis* 2014 Nov; 73 (11): 1942–1948.
51. Dixon W.G., Watson K., Lunt M. et al. Rates of serious infection, including site-specific and bacterial intracellular infection, in rheumatoid arthritis patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum* 2006; 54 (8): 2368–2376.
52. Greenberg J.D., Reed G., Kremer J.M. et al. Association of methotrexate and tumour necrosis factor antagonists with risk of infectious outcomes including opportunistic infections in the CORRONA registry. *Ann Rheum Dis* 2010 Feb; 69 (2): 380–386.
53. Salmon-Ceron D., Tubach F., Lortholary O. et al. Drug-specific risk of non-tuberculosis opportunistic infections in patients receiving anti-TNF therapy reported to the 3-year prospective French RATIO registry. *Ann Rheum Dis* 2011; 70 (4): 616–623.
54. Takeuchi T., Tatsuki Y., Nogami Y. et al. Postmarketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67 (2): 189–194.
55. Koike T., Harigai M., Inokuma S. et al. Postmarketing surveillance of the safety and effectiveness of etanercept in Japan. *J Rheumatol* 2009; 36 (5): 898–906.
56. Komano Y., Tanaka M., Nanki T. et al. Incidence and risk factors for serious infection in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors: a report from the Registry of Japanese Rheumatoid Arthritis Patients for Longterm Safety. *J Rheumatol* 2011; 38 (7): 1258–1264.
57. Beukelman T., Xie F., Baddley J.W. et al. Brief report: incidence of selected opportunistic infections among children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2013; 65 (5): 1384–1389.
58. Mori S., Sugimoto M. Pneumocystis jirovecii Pneumonia in Rheumatoid Arthritis Patients: Risks and Prophylaxis Recommendations. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2015; 9: Suppl 1: 29–40.
59. Louie G.H., Wang Z., Ward M.M. Trends in hospitalizations for Pneumocystis jirovecii pneumonia among patients with rheumatoid arthritis in the US: 1996–2007. *Arthritis Rheum* 2010; 62 (12): 3826–3827.
60. Kourbeti I.S., Ziakas P.D., Mylonakis E. Biologic therapies in rheumatoid arthritis and the risk of opportunistic infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2014; 58 (12): 1649–1657.
61. Foocharoen C., Siriphannon Y., Mahakkanukrauh A. et al. Incidence rate and causes of infection in Thai systemic sclerosis patients. *Int J Rheum Dis* 2012; 15 (3): 277–283.
62. Tashkin D.P., Elashoff R., Clements P.J. et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354 (25): 2655–2666.
63. Galli M., Antinori S., Atzeni F. et al. Recommendations for the management of pulmonary fungal infections in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35 (6): 1018–1028.
64. Winthrop K.L., Baddley J.W. Pneumocystis and glucocorticoid use: to prophylax or not to prophylax (and when?); that is the question. *Ann Rheum Dis* 2018; 77 (5): 631–633.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Белов Борис Сергеевич — д. м. н., зав. лабораторией изучения коморбидных инфекций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГНБУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва

Тарасова Галина Михайловна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории изучения коморбидных инфек-

ций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГНБУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва

Буханова Дарья Валерьевна — аспирант лаборатории изучения коморбидных инфекций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГНБУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва



Полисан

Жизнь продолжается! Цитофлавин

Комплекс для восстановления
метаболизма нейронов

- показан при симптомах неврастении (снижении умственной и физической работоспособности) ¹
- положительно влияет на когнитивно-мнестические функции ²
- снижает симптомы постинфекционной астении ³



Включен в
ЖНВЛП

www.polysan.ru

РЕКЛАМА. Регистрационный номер ЛС-001767 от 13.09.2011

Литература:

1. Инструкция по медицинскому применению препарата Цитофлавин.

2. Суслина З.А. и соавт. «Коррекция астеноневротического синдрома (по материалам многоцентрового рандомизированного исследования)» // Журнал «Фармация. Главный врач» 2007, №2.

3. Шабанов П. Д. и соавт. «Синтетические индукторы интерферона в лечении и профилактике острых воспалительных заболеваний дыхательных путей» // Журнал «Поликлиника», 2015, №3.

