

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 64



9–10'2019

Научно-практический журнал

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

«Антибиотики и химиотерапия» —
ежемесячный научно-практический
журнал

Основан в 1956 году

«Antibiotics and Chemotherapy»

Issued 12 times a year

Since 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.
ГНЦА

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: journalgnca@yandex.ru

Зав. редакцией Л. Б. Смирнова

Сайт: www.jantchem.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: gncajournal@yandex.ru

Л. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

• индекс **71404** — для индивидуальных
подписчиков

• индекс **71405** — для предприятий и ор-
ганизаций

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

• индекс **10659** — для индивидуальных
подписчиков

• индекс **10660** — для предприятий и ор-
ганизаций

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

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 64

9—10'2019

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. Кочеровец 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.

Бибилова М. В.

Васильев А. Н.

Волжанин В. М.

Дмитриева Н. В.

Долгова Г. В.

Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.

Клясова Г. А.

Ленёва И. А.

Митрохин С. Д.

Сычев Д. А.

Тец В. В.

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

Original Papers

- Смолина Т. П., Кузнецова Т. А., Иванушко Л. А.,
Гажга А. К., Сильченко А. С., Беседнова Н. Н.
Фенотипические изменения субпопуляций
NK- и NKT-клеток человека
сульфатированными полисахаридами
Алиева К. Н., Голикова М. В., Портной Ю. А., Фирсов А. А.
Комбинированная терапия как путь к предотвращению
антибиотикорезистентности бактерий:
линезолид—даптомицин против *Staphylococcus aureus*
Орябинская Л. Б., Прасанна Д. Б., Лазаренко Л. Н.
Пробиотические и биотерапевтические свойства
танназопозитивного штамма
Lactobacillus plantarum MTCC 2621
Беляков С. В., Кедик С. А., Шаталов Д. О.,
Ахмедова Д. А., Деменюк П. Ю.
Исследование хронической токсичности субстанции
«Разветвлённый олигогексаметиленгуанидина
гидрохлорид» при орошении полости рта

- 3** Smolina T. P., Kuznetsova T. A., Ivanushko L. A., Gazha A. K.,
Silchenko A. S., Besednova N. N.
Phenotypic Changes in Subpopulations
of Human NK and NKT Cells Induced
by Sulfated Polysaccharides
8 Alieva K. N., Golikova M. V., Portnoy Y. A., Firsov A. A.
Antibiotic Combinations Preventing Bacterial Resistance:
Studies on an *in vitro* Model with *Staphylococcus aureus*
Exposed to Linezolid—Daptomycin
14 Oryabinskaya L. B., Prasanna D. B., Lazarenko L. N.
Probiotic and Biotherapeutic Properties
of Tannase Positive *Lactobacillus plantarum*
MTCC 6 Strain
21 Belyakov S. V., Kedik S. A., Shatalov D. O.,
Akhmedova D. A., Demenyuk P. Yu.
Chronic Toxicity Study of the Substance
"Branched oligo(hexamethylene guanidine) hydrochloride"
During Oral Irrigation

В помощь практикующему врачу

Guidelines for Practitioners

- Соколова В. И., Сычёв Д. А.,
Васильева Е. И., Серёдкин Е. А.
Менингит: трудности диагностики,
клиника и лечение
Кузьмина Т. Н., Рогова Н. В.
Стратификация факторов, влияющих
на эффективность антибактериальной терапии раневых
дефектов при синдроме диабетической стопы
Данилов А. И., Козлов С. Н.,
Жаркова Л. П., Евсеев А. В., Младов В. В.
Инъекционная наркомания
как фактор риска инфекционного эндокардита
Мазина Н. К., Анисимова С. Г.
Влияние митохондриальных субстратов
и кофакторов на выработку и состав слёзной жидкости
при синдроме сухого глаза профессионального гонимца

- 26** Sokolova V. I., Sychev D. A.,
Vasilieva E. I., Seredkin E. A.
Meningitis: Difficulties in Diagnosis,
Clinical Characteristics, and Treatment
33 Kuzmina T. N., Rogova N. V.
Stratification of Factors Determining the Effectiveness
of Antibacterial Therapy of Wound Defects
in Diabetic Foot Syndrome
39 Danilov A. I., Kozlov S. N., Zharkova L. P.,
Evseev A. V., Mladov V. V.
Injecting Drug Addiction as
a Risk Factor for Infective Endocarditis
44 Mazina N. K., Anisimova S. G.
Influence of Mitochondrial Substrates
and Cofactors on Tear Liquid Production
and Components in Occupational Dry Eye Syndrome

Обзоры

Reviews

- Сизикова Т. Е., Лебедев В. Н., Петров А. А., Борисевич С. В.
Оценка эффективности неспецифических средств
медицинской защиты в отношении заболевания,
вызванного вирусом Эбола

- 50** Sizikova T. E., Lebedev V. N., Petrov A. A., Borisevich S. V.
Evaluation of the Effectiveness
of Nonspecific Medical Protection Against
Diseased, Caused of Ebola Virus

Некролог

Obituary

Памяти Г. В. Долговой

- 56** In Memory of G. V. Dolgova

* 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.

Фенотипические изменения субпопуляций NK- и NKT-клеток человека сульфатированными полисахаридами

*Т. П. СМОЛИНА¹, Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Л. А. ИВАНУШКО¹, А. К. ГАЖА¹, А. С. СИЛЬЧЕНКО², Н. Н. БЕСЕДНОВА¹

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

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Phenotypic Changes in Subpopulations of Human NK and NKT Cells Induced by Sulfated Polysaccharides

*T. P. SMOLINA¹, T. A. KUZNETSOVA¹, L. A. IVANUSHKO¹, A. K. GAZHA¹, A. S. SILCHENKO², N. N. BESEDNOVA¹

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok

Изучено влияние сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens* (фукоидана) и продукта его ферментативной трансформации на NK- и NKT-клетки человека. В результате инкубации цельной крови с полисахаридами зарегистрированы значимые фенотипические изменения NK и NKT-клеток. Это проявлялось в увеличении экспрессии активационных молекул CD69, CD25, HLA-DR и маркера дегрануляции CD107a на NK- и NKT-клетках, а также молекул CD8 на NK-клетках. Эффект продукта ферментативной трансформации был значимо более выражен по сравнению с нативным полисахаридом только в отношении экспрессии CD69.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, фукоидан, ферментативная трансформация фукоидана, врождённый иммунитет, маркеры активации, NK-клетки, NKT-клетки.

The article studies the effect of sulfated polysaccharide extracted from brown algae *Fucus evanescens* (fucoidan) and the product of its enzymatic transformation on human NK and NKT cells. Significant phenotypic changes in NK and NKT cells were recorded as a result of incubation of whole blood with polysaccharides. This was manifested in an increase in the expression of the activation molecules CD69, CD25, HLA-DR and the degranulation marker CD107a on NK and NKT cells, as well as CD8 molecules on NK cells. The effect of the enzymatic transformation product was significantly more pronounced compared to the native polysaccharide only in relation to the expression of CD69.

Keywords: sulfated polysaccharides, fucoidan, enzymatic transformation of fucoidan, innate immunity, activation markers, NK cells, NKT cells.

Введение

Врождённый иммунитет является первой линией защиты организма от патогенов. NK- и NKT-клетки — одни из главных эффекторных клеток врождённого иммунитета, способных осуществлять элиминацию заражённых и повреждённых клеток организма. Стимуляция NK- и NKT-клеток различными растворимыми веществами и/или контактными взаимодействиями приводит к изменению их фенотипа и возможности более эффективно осуществлять свои функции [1].

Для поиска препаратов, активирующих клетки врождённого иммунитета, перспективно применение фукоиданов — биологически активных сульфатированных полисахаридов, синтезируемых бурными водорослями. Низкая токсичность и биологическая активность фукоиданов обуслов-

ливает интерес к ним учёных во всем мире. Структура этих биополимеров может быть различной в зависимости от вида водоросли, сезона сбора, мест её произрастания, и других факторов. Сульфатированные полисахариды являются перспективными для создания фармацевтических препаратов [2–5], однако лекарства на их основе не созданы, т. к. пока нет простых и воспроизводимых методов стандартизации препаратов и недостаточно информации о связи структуры и биологической активности фукоиданов. Биологическая активность фукоиданов зависит от степени сульфатирования, моносахаридного состава, степени разветвлённости, типа связи [6, 7], но структурные параметры, отвечающие за проявление той или иной биологической активности, не установлены. Применение ферментативной трансформации фукоиданов может быть перспективным для стандартизации природных полисахаридов, определения их структуры, увеличения биологической активности и снижения побочных эффектов [8].

© Коллектив авторов, 2019

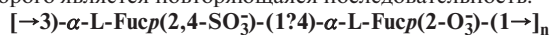
*Адрес для корреспонденции: 690087, Владивосток, Сельская, 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова

Ранее нами было проведено сравнительное исследование действия сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens* и продукта ферментативной трансформации этого полисахарида на функциональную активность нейтрофилов периферической крови человека. Показано повышение уровня экспрессии молекул CD69, CD14, CD11b на клеточных мембранах нейтрофилов с одновременным снижением CD62L, а также увеличение показателей фагоцитарной и бактерицидной активности этих клеток. Полисахарид, полученный из фукоидана с применением фукоиданаз путём ферментативной трансформации оказывал более выраженный эффект на уровень экспрессии молекул CD14, CD11b и CD62L по сравнению с более высокомолекулярным [9]. Эти результаты дали нам основание для проведения исследования действия этих же полисахаридов на клетки врождённого иммунитета NK и NKT, обладающие цитолитической активностью и осуществляющие регуляторные функции.

Целью работы явилось сравнительное изучение влияния сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens* и продукта его ферментативной трансформации на функциональную активность и изменение фенотипа NK- и NKT-лимфоцитов периферической крови человека. Для этого исследовали изменение экспрессии молекул CD25, CD69, HLA-DR, CD107a на мембранах NK- и NKT-клеток, а также CD8 на NK-клетках.

Материал и методы

Сульфатированные полисахариды выделены из бурой водоросли *Fucus evanescens* (табл. 1). Первый полисахарид — фукоидан в комплексе с полифенолами (Ф1) с молекулярной массой 130–430 кДа [10]; второй — продукт ферментативного гидролиза фукоидана (Ф2) с молекулярной массой 50,8 кДа [11] (см. табл. 1), главным структурным элементом молекул которого является повторяющаяся последовательность:



Материалом для исследования и контрольных проб служила полученная от условно здоровых доноров периферическая кровь с гепарином (25 ЕД/мл), которую разводили в соотношении 1:2 полной питательной средой (среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональную телячью сыворотку, 0,01 М НЕРЕС, 200 мМ L-глутамин, 100 мг/мл гентамицина). Использование для экспериментов цельной крови не требует выделения и подготовки клеток к культивированию, устраняет неспецифическую активацию клеток на этапах сепарации, при этом сохраняется существующий *in vivo* баланс различных типов клеток крови.

Для контрольных проб Ф1 и Ф2 растворяли в полной питательной среде и вносили в кровь в конечной концентрации 100 мкг/мл (оптимальную дозу определили в предваритель-

ных экспериментах). Инкубировали опытные и контрольные пробы в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Уровень экспрессии молекул определяли методом цитометрического анализа в программе «Cell Quest» на проточном цитометре «FACSCalibur» («Becton Dickinson») с использованием моноклональных антител к молекулам CD56-FITC, CD3-APC, CD8-PE, CD25-PE, HLA-DR-PE, CD69-PE («Beckman Coulter»), CD107a-PE («eBioscience») и соответствующих изотипических контролей. NK-клетки идентифицировали как субпопуляцию лимфоцитов CD3-CD56+, NKT как лимфоциты CD3+CD56+. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ клеток.

Результаты представлены как процент NK- и NKT-клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры. Плотность (количество) молекул на поверхности клеток отражены в виде условных единиц средних интенсивностей флуоресценции (MFI).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами непараметрической статистики, которые включали расчёт медианы и квартильного размаха (разность значений 75-го и 25-го процентиля), а также оценку различий с использованием критерия Вилкоксона для связанных групп.

Результаты и обсуждение

Активность NK-клеток регулируется сложным набором рецепторов, экспрессия которых может изменяться под действием различных веществ. В результате исследования установлено, что после 24-часовой инкубации клеток крови как с Ф1, так и с Ф2 изменялся субпопуляционный состав NK-клеток: наблюдалось увеличение относительного количества NK-клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD69) и поздней (CD25 и HLA-DR) активации, а также молекулы CD8 (рисунок). Отмечено также возрастание MFI этих маркеров, отражающих плотность их молекул на мембранах клеток. Эффект Ф2 был значительно более выражен по сравнению с Ф1 только в отношении экспрессии CD69.

Известно, что трансмембранный гликопротеин CD69 является одним из самых ранних индуцибельных поверхностных маркеров активированных Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток, нейтрофилов, эозинофилов, который участвует в пролиферации клеток и функционирует в качестве сигнального рецептора лимфоцитов. Молекулы CD69 не экспрессируются на интактных лимфоцитах, в том числе и на NK-клетках, а появляются на их поверхности после активации клеток различными стимулами. Экспрессию CD69 на NK-клетках связывают с их цитотоксической функцией [12].

Так как молекулы CD69 имеют прямое отношение к активации генов, ответственных за синтез интерлейкина-2, то сигналы, поступающие с CD69, могут вызывать как увеличение продукции

Таблица 1. Характеристики фукоиданов из бурой водоросли *Fucus evanescens*

Полисахарид	SO ₃ Na*, %	Нейтральные сахара, мольные %				
		Fuc	Gal	Xyl	Man	Glc
Ф1	27,0	94,1	3,8	2,1	0	0
Ф2	29,7	97,8	2,2	0	0	0

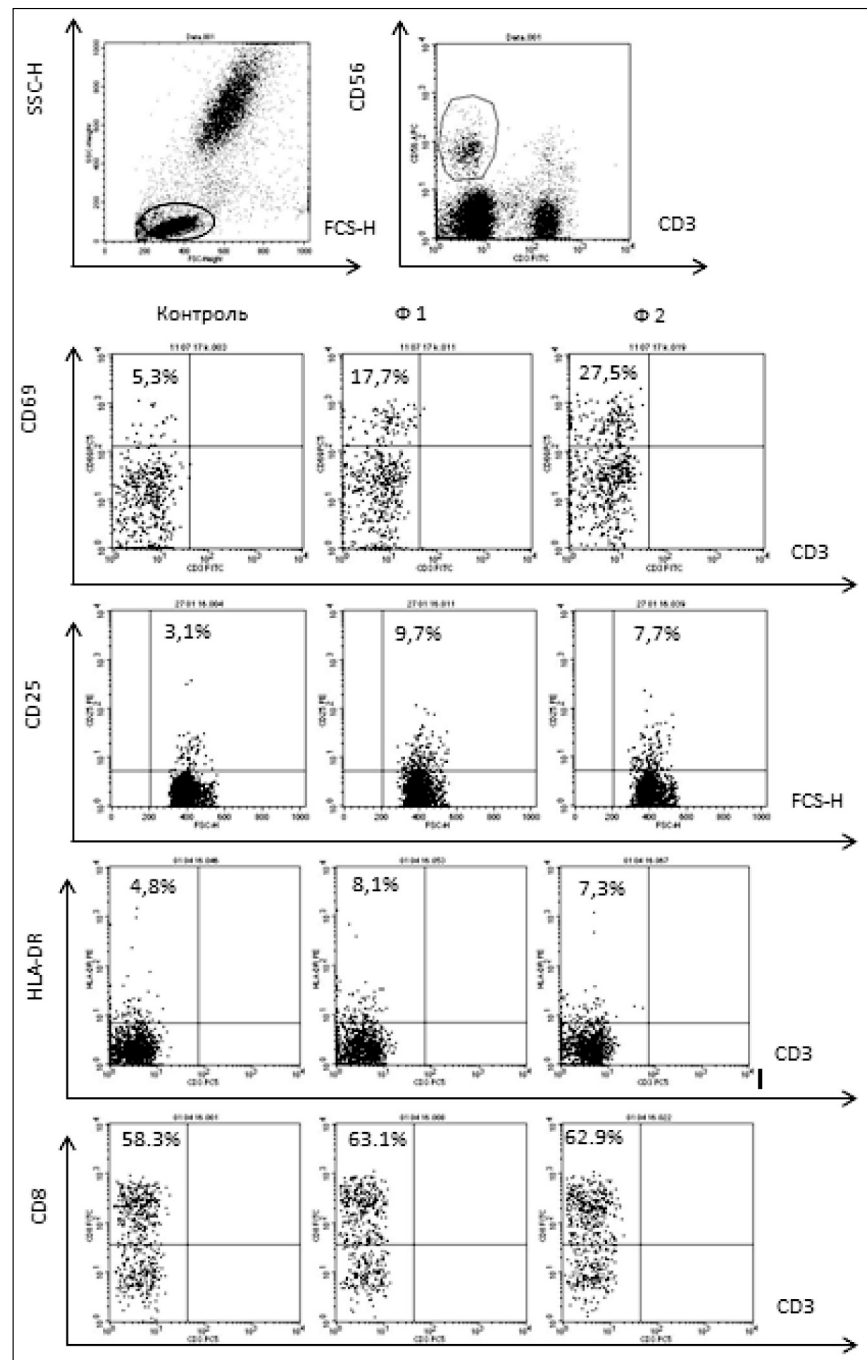
Примечание. * — процент от массы.

этого цитокина, так и количества рецепторов к нему (CD25) на клетках [13], экспрессию которых принято считать одной из ключевых стадий процесса активации.

Экспрессируясь на НК-клетках, CD25 позитивно коррелирует с их цитотоксической функцией, увеличивая дегрануляцию и процент гибели клеток-мишеней, а также продукцию ИФН- γ [14].

В отличие от белков МНС I класса, которые находятся на большинстве клеток человека, белки МНС II класса обычно экспрессируются профессиональными антиген-представляющими клетками. Однако экспрессия молекул HLA-DR была обнаружена и на НК-клетках, где они вначале считались маркерами активации, т. к. экспрессировались после стимуляции НК-клеток IL-2 [15, 16]. Позже было показано, что HLA-DR-положительные НК-клетки могут представлять антигены Т-клеткам с рестрикцией по HLA-DR [17]. Кроме того, выявлена корреляция между процентом НК-клеток, экспрессирующих HLA-DR, и уровнем транскрипции генов IFN- γ НК-клетками [18]. Таким образом, НК-клетки обладают способностью представлять антиген, по крайней мере, в определённых обстоятельствах. HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки проявляют большую литическую способность и экспрессируют хемокиновый рецептор, связанный как с привлечением клеток к участкам воспаления, так и с возвращением их в лимфатический узел. Показано что, HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки могут играть существенную роль во время инициации и усиления воспалительных реакций, обеспечивая регуляцию иммунного ответа [19].

Достаточно часто НК-клетки экспрессируют на своей поверхности α -цепь CD8, но в более низкой плотности, чем цитотоксические Т-клетки. Субпопуляции НК-клеток человека, экспрессирующие $\alpha\alpha$ гомодимер CD8, обладают большей цитотоксичностью, т.к. соединение CD8 α цепей



Влияние фукоидана (F1) и продукта его ферментной трансформации (F2) на экспрессию мембранных молекул НК-клетками человека

в гомодимер индуцирует быстрое повышение внутриклеточного Ca^{2+} и инициированное этим увеличение экспрессии CD69. Хотя секреция цитолитических ферментов инициирует апоптоз НК-клеток, приток экзогенного кальция защищает CD8 α^+ НК-клетки от данного процесса. Этот механизм позволяет CD8 α^+ НК-клеткам сохранять жизнеспособность и принимать участие в многократном лизисе клеток-мишеней [20].

При активации НК-клеток на их мембране регистрируется экспрессия маркера CD107a, который характеризуется как трансмембранный белок

Таблица 2. Уровень экспрессии рецепторов на поверхности NKT-клеток после инкубации (24 ч) с фукоидами

Маркеры	Единица измерения	Контроль	Ф1	Ф2
		Me (Min–max)	Me (Min–max)	Me (Min–max)
CD69+	% клеток	5,3 (3,5–6,4)	6,5* (4,0–7,8)	10,0* (8,1–11,3)
	MFI	11,0 (7,3–13,5)	14,1* (13,7–16,4)	22,2* (18,4–25,0)
CD25+	% клеток	4,3 (2,5–5,1)	5,5* (5,0–7,7)	4,8* (4,6–7,2)
	MFI	5,8 (3,2–6,4)	6,3* (5,9–8,7)	6,4* (5,9–8,9)
HLA-DR+	% клеток	6,8 (4,5–7,4)	7,6* (6,9–8,9)	9,7* (7,5–10,8)
	MFI	3,4 (1,7–4,5)	4,6* (3,8–6,1)	4,9* (3,9–6,3)
CD107a+	% клеток	1,2 (0,5–2,1)	3,1* (2,5–4,9)	3,3* (2,6–5,1)

Примечание. Me – медиана; (Min–max) – минимальное и максимальное значение; * – различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) по отношению к контролю.

LAMP-1 (lysosomal associated membrane protein1) и является маркером дегрануляции NK- и цитотоксических Т-клеток. [21]. Инкубация клеток крови с Ф1 приводила к увеличению относительного количества NK-клеток, экспрессирующих на поверхности CD107a, до $1,3 \pm 0,7\%$ (контроль — $0,7 \pm 0,9\%$). Ф2 увеличивал относительное количество CD107a-позитивных NK-клеток до $2,6 \pm 0,9\%$.

Таким образом, возрастание экспрессии молекул CD69, CD25, HLA-DR и CD8 может приводить к активации NK-клеток, увеличению их цитотоксического потенциала, продукции ИФН- γ , инициации и регуляции иммунного ответа.

Поскольку NKT-клетки представляют собой уникальную и гетерогенную популяцию Т-клеток, которые имеют некоторые функциональные и фенотипические характеристики, сходные с NK-клетками, то следующим этапом исследования была оценка действия Ф1 и Ф2 на изменение уровня экспрессии CD69, CD25, HLA-DR и CD107a NKT-клетками [22]. NKT-лимфоциты экспрессируют как маркеры NK-клеток, так и Т-клеточные дифференцировочные антигены и играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа, связывая механизмы врожденного и адаптивного иммунитета. Подобно NK-клеткам, NKT идентифицируются как регуляторы врожденного иммунного ответа и распознают гликолипидные антигены, представленные молекулой CD1d [23]. NKT-клетки, в отличие от других Т-клеток, могут осуществлять немедленный тип ответа на патогены без стадии антигензависимой дифференцировки, которая необходима для образования эффекторных Т-клеток. При активации NKT-клетки осуществляют быструю дегрануляцию и секрецию цитокинов, с помощью которых регулируют функции клеток врожденного иммунитета и участвуют в индукции адаптивного иммунного ответа [24]. NKT-клетки, продуцирующие цитокины, участвуют в регуляции иммунного ответа, который осуществляется путём активации как Th1-, так и Th2-клеток, и необходим для защиты организма от инфекций и развития опухолей. Изучение возможности воздействия на активность NKT-клеток может иметь решающее значение в

клинике при инфекционных заболеваниях, аутоиммунных процессах и в лечении злокачественных новообразований [25].

После 24-часовой инкубации крови с полисахаридами (Ф1 и Ф2) увеличивались как относительное количество NKT-лимфоцитов, экспрессирующих CD69, CD25 и HLA-DR, так и плотность экспрессии этих маркеров. Как и на NK-клетках, более выраженное действие Ф2 по сравнению с Ф1 оказывал только на уровень экспрессии CD69 (табл. 2). Кроме того, Ф1 и Ф2 увеличивали относительное количество NKT-клеток, экспрессирующих на поверхности CD107a.

Эти данные свидетельствуют о том, что Ф1 и Ф2 активируют NKT-клетки, хоть и малочисленную субпопуляцию, но тем не менее играющую важнейшую роль в регуляции направленности действия иммунного ответа, что очень важно для разработки фармакологических препаратов.

Результатом активации NK- и NKT-клеток является секреция ими цитокинов. Полученные ранее нами результаты показали, что Ф1 и Ф2 в системе *in vitro* усиливают продукцию провоспалительных (TNF α , IFN- γ , IL-8) цитокинов и регуляторного медиатора IL-10 [26].

NK- и NKT-клетки участвуют практически во всех реакциях иммунной системы и, увеличивая синтез IFN γ , вносят вклад в развитие Th1-иммунного ответа.

Полисахариды являются природными биополимерами и широко используются в качестве продуктов питания, косметических средств и фармацевтических препаратов. Химическая или ферментативная модификация структуры природных полисахаридов может использоваться для возможности их стандартизации и снижения побочных эффектов. При этом важно сохранить биологическую активность природных полисахаридов. Ферментативные биопроцессы, применяющиеся для трансформации полисахаридов, являются более специфичными и избирательными по сравнению с химическими методами. Наши исследования показали, что продукт ферментативного гидролиза (Ф2), характеризующийся более низкой молекулярной массой (50,8 кДа), чем Ф1

(130–430 кДа), выделенный из бурой водоросли *Fucus evanescens*, не потерял биологической активности. Оба полисахарида увеличивают экспрессию молекул активации (CD69, CD25, HLA-DR) и маркера дегрануляции (CD107a) на НК- и НКТ-клетках, а также субпопуляцию CD8-позитивных НК-клеток. Фенотипические изменения НК- и НКТ-клеток приводят к возрастанию их цитотоксического потенциала и возможности регуляции иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farag S.S., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; 20: 123–137.
2. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs* 2011; 9: 196–223.
3. Pomin V.H. Marine non-glycosaminoglycan sulfated glycans as potential pharmaceuticals. *Pharmaceuticals* 2015; 8: 848–864.
4. Jesus Raposo M.F., Morais A.M., Morais R.M. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar Drugs* 2015; 13 (5): 2967–3028.
5. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L. et al. A comparative study of anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007; 17 (5): 541–552.
6. Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H., Soeda S., Shimeno H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem Pharmacol* 2003; 65 (2): 173–179.
7. Berteau O., Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 2003; 13 (6): 29–40.
8. Kusaykin M.I., Chizhov A.O., Grachev A.A., Alekseeva S.A., Bakunina I.Yu., Nedashkovskaya O.I. et al. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates. *Journal of Applied Phycology* 2006; 18: 369–373.
9. Кузнецова Т.А., Смолина Т.П., Беседнова Н.Н., Сильченко А.С., Имбс Т.И., Ермакова С.П. Влияние сульфатированных полисахаридов из бурой водоросли *Fucus evanescens* и продукта их ферментативной трансформации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета. *Антибиотики и химиотер.* — 2016. — Т. 61. — № 7–8. — С. 10–14. / Kuznetsova T.A., Smolina T.P., Besednova N.N., Silchenko A.S., Imbs T.I., Ermakova S.P. Vliyaniye sul'fatirovannykh polisakharidov iz buroy vodorosli *Fucus evanescens* i produkta ikh fermentativnoy transformatsii na funktsional'nuyu aktivnost' kletok vrozhdennogo immuniteta. *Antibiotiki i khimioter* 2016; 61 (7–8): 10–14. [in Russian]
10. Anastuyuk S.D., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. Structural similarities of fucoidans from brown algae *Silvetia babingtonii* and *Fucus evanescens*, determined by tandem MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr Res* 2012; 358: 78–81.
11. Сильченко А.С. Фукоиданазы и альгинат-лиазы морской бактерии *Formosa algae* KMM 3553T и морского моллюска *Lambis* sp.: автореф. дис. канд. хим. наук: Владивосток. 2014. — 24 с. / Silchenko A.C. Fukoidanazy i al'ginat-liazy morskoy bakterii *Formosa algae* KMM 3553T i morskogo molljyuska *Lambis* sp.: avtoref. dis. kand. khim. nauk: Vladivostok. 2014; 24. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смолина Татьяна Павловна — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Иванушко Людмила Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник лаб. иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

В связи с тем, что НК- и НКТ-клеткам принадлежит важнейшая роль в иммунологическом надзоре, представляется перспективным дальнейшее исследование природных и ферментативно трансформированных сульфатированных полисахаридов из *Fucus evanescens* с целью создания на их основе фармакологических противовирусных и противоопухолевых препаратов.

12. Borrego F., Robertson M.J., Ritz J., Pena J., Solana R. CD69 is stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect. *Immunology* 1999; 97 (1): 159–165.
13. Marzio R., Mauel J., Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 21 (3): 565–582.
14. Rudnicka K., Matusiak A., Chmiela M. CD25 (IL-2R) expression correlates with the target cell induced cytotoxic activity and cytokine secretion in human natural killer cells. *Acta Biochim Pol* 2015; 62 (4): 885–894.
15. Skak K., Frederiksen K.S., Lundsgaard D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* 2008; 123 (4): 575–583.
16. Li W., Janowicz D.M., Fortney K.R., Katz B.P., Spinola S.M. Mechanism of human natural killer cell activation by *Haemophilus ducreyi*. *J Infect Dis* 2009; 200 (4): 590–598.
17. Roncarolo M.G., Bigler M., Haanen J.B., Yssel H., Bacchetta R., de Vries J.E. et al. Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens. *J Immunol* 1991; 147 (3): 781–787.
18. Yano N., Endoh M., Nomoto Y., Sakai H., Rifai A. Increase of HLA-DR-positive natural killer cells in peripheral blood from patients with IgA nephropathy. *Hum Immunol* 1996; 49 (1): 64–70.
19. Evans J.H., Horowitz A., Mehrabi M., Wise E.L., Pease J.E., Riley E.M., et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur J Immunol* 2011; 41 (7): 1924–1933.
20. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S. et al. Ligation of CD8 α on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* 2005; 116 (3): 354–361.
21. Betts M.R., Koup R.A. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol* 2004; 75: 497–512.
22. Emoto M., Kaufmann S.H. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol* 2003; 24 (7): 364–369.
23. Loza M.J., Metelitsa L.S., Perussia B. NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production. *Eur J Immunol* 2002; 32 (12): 3453–3462.
24. Colucci F.I., Caligiuri M.A., Di Santo J.P. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003; 3 (5): 413–425.
25. Godfrey D.I., MacDonald H.R., Kronenberg M.M., Smyth M.J., Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4 (3): 231–237.
26. Иванушко Л.А., Имбс Т.И. Сравнительное изучение цитокиндирующих свойств фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и его производных. *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* — 2017. — № 70. — С. 60–62. / Ivanushko L.A., Imbs T.I. Sravnitel'noe izucheniye tsitokinidut-siruyushchikh svoystv fukoidana iz buroy vodorosli *Fucus evanescens* i ego proizvodnykh. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka* 2017; 70: 60–62. [in Russian]

Гажа Анна Константиновна — к. м. н., старший научный сотрудник лаб. иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Сильченко Артем Сергеевич — к. х. н., старший научный сотрудник лаб. химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

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

Комбинированная терапия как путь к предотвращению антибиотикорезистентности бактерий: линезолид—даптомицин против *Staphylococcus aureus*

К. Н. АЛИЕВА, М. В. ГОЛИКОВА, Ю. А. ПОРТНОЙ, *А. А. ФИРСОВ

ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Antibiotic Combinations Preventing Bacterial Resistance: Studies on an *in vitro* Model with *Staphylococcus aureus* Exposed to Linezolid—Daptomycin

K. N. ALIEVA, M. V. GOLIKOVA, Y. A. PORTNOY, *A. A. FIRSOV

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

С целью прогнозирования антимутантной эффективности комбинированной терапии исследовали селекцию резистентных мутантов *Staphylococcus aureus* при моделировании в динамической системе *in vitro* режимов 5-дневного введения линезолида и даптомицина отдельно и в комбинации. Во всех случаях значения площади под кривой «концентрация — время» (ПФК₂₄) составляли 120 мкг×ч/мл (линезолид) и 240 мкг×ч/мл (даптомицин). При монотерапии популяция стафилококка обогащалась линезолидорезистентными и, в меньшей степени, даптомицинорезистентными мутантами. Применение тех же антибиотиков в комбинации позволило предотвратить или ингибировать развитие резистентности у стафилококков к линезолиду и даптомицину, соответственно. Отмеченное усиление антимутантной эффективности происходило на фоне снижения значений МПК_М антибиотиков под влиянием друг друга и увеличением времени, в течение которого концентрация антибиотика превышает МПК_М. Полученные результаты подтверждают возможность прогнозирования антимутантной эффективности комбинированной антибиотикотерапии по результатам оценки МПК_М.

Ключевые слова: линезолид, даптомицин, комбинация, резистентность *S. aureus*, динамическая система *in vitro*.

To predict the anti-mutant effects of antibiotic combinations against *Staphylococcus aureus*, the mutant prevention concentrations (MPCs) of linezolid and daptomycin were determined at a linezolid-to-daptomycin concentration ratio that corresponds to the ratio of the 24-hour areas under the concentration-time curve (AUC_{24s}) that were used in pharmacokinetic simulations in an *in vitro* dynamic model. The enrichment of linezolid-resistant mutants of two *S. aureus* strains was observed under linezolid exposure. The growth of daptomycin-resistant mutants exposed to daptomycin was less pronounced. Combination therapy prevented or restricted the development of *S. aureus* resistance to linezolid or daptomycin, respectively. These findings support the applicability of MPC determination to predict the anti-mutant effects of combination therapy with linezolid and daptomycin.

Keywords: linezolid, daptomycin, combination, *S. aureus* resistance, *in vitro* dynamic model.

Введение

Проблема распространения резистентных штаммов бактерий на фоне широкого применения антибиотиков в клинике приобретает всё большее значение, поскольку является причиной снижения их эффективности. Возрастание значений МПК антибиотиков в отношении бактериальных штаммов в свою очередь влечёт за собой снижение клинических значений ПФК₂₄/МПК (площади под фармакокинетической кривой в пределах 24 ч, ПФК₂₄, деленной на МПК), которые могут не достигать антимутантных уровней. Прогноз антимутантной эффективности клинических режимов антибиотикотерапии на основа-

нии зависимости развития резистентности у *Staphylococcus aureus* к 4 фторхинолонам от моделируемых значений их ПФК₂₄/МПК был впервые осуществлён с применением динамических систем *in vitro* [1]. При этом терапевтические значения ПФК₂₄/МПК трёх из четырёх фторхинолонов оказались ниже их антимутантных значений ПФК₂₄/МПК по отношению к *S. aureus*. Позднее подобная ситуация была отмечена и с другими антибиотиками, например с линезолидом [2, 3], что согласуется с сообщениями о случаях выделения устойчивых штаммов *S. aureus* в процессе длительной терапии линезолидом [4–12]. В этой связи проведение исследований по изучению антимутантной эффективности комбинаций линезолида с другими антистафилококковыми препаратами представляется актуальным. Ранее, комбинации линезолида с рифампицином [13] или гентамици-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 119021, Большая Пироговская ул., д. 11, стр. 1. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе

ном [14] в динамических системах *in vitro* характеризовались повышенной антимутантной эффективностью, которую удалось объяснить изменениями значений минимальной концентрации, подавляющей рост резистентных мутантов (МПК_М), каждого из препаратов в присутствии второго. Соотношения концентраций линезолида и рифампицина или линезолида и гентамицина при оценке МПК_М соответствовали отношениям их ПФК₂₄, моделируемых в фармакодинамических экспериментах. Снижение значений МПК_М обоих препаратов в комбинации обеспечивало более продолжительное нахождение моделируемых концентраций антибиотиков на уровнях, превышающих МПК_М и, как следствие, повышало антимутантную эффективность комбинированной терапии. В настоящей работе тот же подход был использован при изучении антимутантной эффективности комбинации линезолида с даптомицином, который по результатам оценки антистафилококковой активности методом шахматной доски показывал синергизм с линезолидом [15].

Антимутантные свойства комбинации линезолида с даптомицином по сравнению с таковыми при монотерапии изучали при моделировании субтерапевтических значений их ПФК₂₄. Отношение моделируемых значений ПФК₂₄ линезолида и даптомицина, равное 1:2, также было использовано при определении значений МПК_М линезолида и даптомицина в комбинации.

Материал и методы

Антибиотики, бактериальные штаммы. Линезолид был приобретён в Molekula Limited (Darlington, United Kingdom), даптомицин — в Acros Organics (Geel, Belgium). Поскольку антибактериальная активность даптомицина в значительной степени обусловлена присутствием ионов Ca²⁺, все эксперименты с использованием даптомицина проводили в питательной среде, содержащей ионы Ca²⁺ в концентрации, равной значению, установленному в крови у человека (50 мг/л) [16].

В работе были использованы 2 штамма *S.aureus*: клинический — *S.aureus* 2061, и коллекционный — *S.aureus* ATCC 700699.

Определение МПК_М. Значения МПК_М линезолида и даптомицина по отдельности и в комбинации определяли по описанной ранее методике [13]. МПК_М антибиотиков в комбинации определяли при соотношении концентраций линезолида и даптомицина, равном 1:2. Это соответствует отношению моделируемых значений ПФК₂₄ линезолида (120 мкг×ч/мл) и даптомицина (240 мкг×ч/мл) в фармакодинамических экспериментах. При определении МПК_М линезолида, в том числе в присутствии даптомицина, использовали инокулят, полученный путём смешивания клеток родительского штамма *S.aureus* и клеток линезолидорезистентных мутантов, полученных из родительских штаммов *S.aureus* путём искусственной селекции в присутствии линезолида, согласно описанной ранее методике [17]. В результате соотношение количества клеток родительского штамма к количеству мутантных клеток *S.aureus* в 1 мл инокулята составляло 10⁸ к 1. Описанная процедура обеспечивает присутствие в общей популяции стафилококка мутантных клеток, устойчивых к линезолиду.

Моделируемые фармакокинетические профили. Моноэкспозиционное снижение концентрации линезолида и даптомицина в экспериментах как с моно-, так и с комбинированной терапией антибиотиками, моделировали с периодами полувыведе-

ния, установленными в клинических исследованиях (6 ч для линезолида [18, 19] и 9 ч для даптомицина [20]), соответственно. Антибиотики вводили в течение 5 дней: линезолид — 2 раза в сутки с интервалом в 12 ч, даптомицин — 1 раз в сутки с интервалом в 24 ч. Моделируемые значения ПФК₂₄ линезолида и даптомицина составляли 120 и 240 мкг×ч/мл, соответственно, и были в 2 раза ниже соответствующих терапевтических значений ПФК₂₄, достигаемых при применении линезолида в дозе 600 мг 2 раза в сутки [18, 19] и даптомицина в дозе 4 мг/кг 1 раз в сутки [20]. Все эксперименты проводились в двух или более повторностях.

Динамическая система *in vitro*. Для изучения антимутантного эффекта линезолида или даптомицина использовали динамическую систему *in vitro*, описанную ранее [3]. Она представляет собой две камеры — одна со свежим бульоном Мюллера–Хинтона (МХБ), другая с МХБ, содержащим бактериальную культуру и антибиотик (центральная камера). Объём центральной камеры составлял 100 мл. Перистальтические насосы обеспечивали приток стерильного бульона в центральную камеру и отток её содержимого с объёмными скоростями, равными 12,7 и 8,5 мл/ч в случае линезолида и даптомицина, соответственно.

Поскольку линезолид и даптомицин характеризуются разными периодами полувыведения, при моделировании комбинированных режимов их дозирования использовался принцип суперпозиции потоков [21]. К системе присоединяли дополнительную камеру объёмом 54 мл, заполненную свежим МХБ с такой же концентрацией даптомицина, как в центральной камере. Свежий бульон подавался в дополнительную камеру со скоростью 4,2 мл/ч, и с той же скоростью среда с даптомицином перемещалась из дополнительной камеры в центральную. Одновременный приток МХБ в центральную камеру шёл со скоростью 8,5 мл/ч, а отток её содержимого — со скоростью 12,7 мл/ч.

Надёжность воспроизведения фармакокинетических профилей антибиотиков была подтверждена при помощи ВЭЖХ [3, 22]. Фактические значения периодов полувыведения линезолида и даптомицина при моно- (в среднем 6,2 ч и 8,8 ч, соответственно) и комбинированной терапии (в среднем 6 ч и 8,6 ч, соответственно) были близки к заданным (6 и 9 ч, соответственно).

Перед началом опыта динамическую систему заполняли свежим МХБ и термостатировали центральную камеру при 37°C. В центральную камеру вносили 18-часовую бактериальную культуру для получения клеток в концентрации, равной 10⁷ КОЕ/мл. Через 2 ч, когда концентрация клеток достигала 10⁸ КОЕ/мл, начинали введение антибиотиков. При проведении исследований с линезолидом, перед введением антибиотиков, в центральную камеру добавляли 1 мл суспензии линезолидорезистентных мутантов *S.aureus* с концентрацией 10² КОЕ/мл. Поскольку объём МХБ в центральной камере составлял 100 мл, финальная концентрация мутантных клеток в МХБ составляла 1 КОЕ/мл [17].

Введение антибиотиков, а также отбор биопроб из центральной камеры проводили при помощи компьютеризованной системы. Популяционный анализ проводили путём посева биопроб каждые 24 ч на чашки с МХА, содержащим линезолид или даптомицин в концентрации, равной 2×МПК. При необходимости пробы разводили стерильной дистиллированной водой перед посевом на чашки с МХА. С целью снижения предела количественного обнаружения резистентных клеток стафилококка в биопробах использовали метод глубинного посева: 100 мкл суспензии без разведения в воде вносили в чашку Петри с 10 мл тёплого (40°C) расплавленного МХА, содержащего антибиотик в заданной концентрации. Поскольку стафилококки являются факультативными анаэробами, культивирование в условиях дефицита кислорода при глубинном посеве не влияло на ростовые свойства клеток.

Оценка эффекта антибиотиков в отношении резистентной субпопуляции *S.aureus*. Изменения численности резистентных мутантов *S.aureus* характеризовали площадью под кривой в пределах от 0 до 120 часов (интегральный параметр ППК_М).

Значения МПК_М антибиотиков (в мкг/мл)

Штамм	МПК _М линезолида	МПК _М линезолида в присутствии даптомицина	МПК _М даптомицина	МПК _М даптомицина в присутствии линезолида
<i>S.aureus</i> 2061	10	4	10	8
<i>S.aureus</i> ATCC 700699	10	3	14	6

Результаты исследования

Определение МПК_М. Значения МПК_М линезолида и даптомицина, применяемых по отдельности и в комбинации, показаны в таблице. Присутствие второго антибиотика вызывало значительное снижение МПК_М, причём снижение МПК_М линезолида под влиянием даптомицина и МПК_М даптомицина под влиянием линезолида было соизмеримым. В случае с клиническим штаммом *S.aureus* 2061 величина МПК_М линезолида снизилась в 2,5 раза, а МПК_М даптомицина — в 1,25 раза. Чуть бо-

лее заметным этот эффект был в отношении коллекционного штамма *S.aureus*: величина МПК_М линезолида снизилась в 3,3 раза, а МПК_М даптомицина — в 2,3 раза.

Антимутантный эффект антибиотиков, применяемых по отдельности и в комбинации. Динамика изменения численности клеток, резистентных к 2×МПК линезолида или даптомицина, на протяжении 120 ч после начала введения каждого антибиотика или их комбинации показана на рис. 1. Как видно на рис. 1, при моделировании режимов

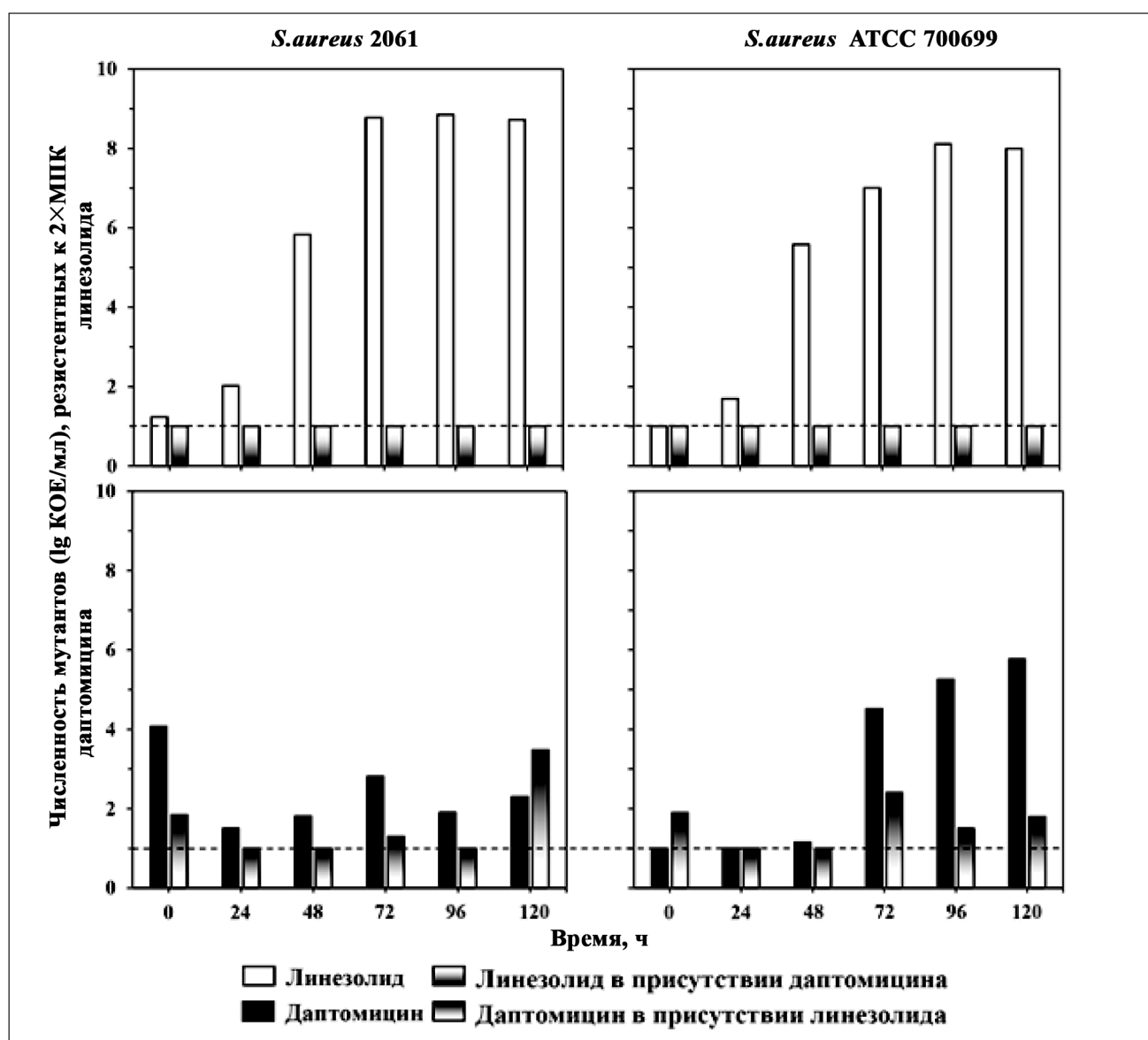


Рис. 1. Численность антибиотикорезистентных клеток *S.aureus* под воздействием линезолида и даптомицина, вводимых по отдельности и в комбинации.

Нижний предел количественного определения обозначен пунктирной линией.

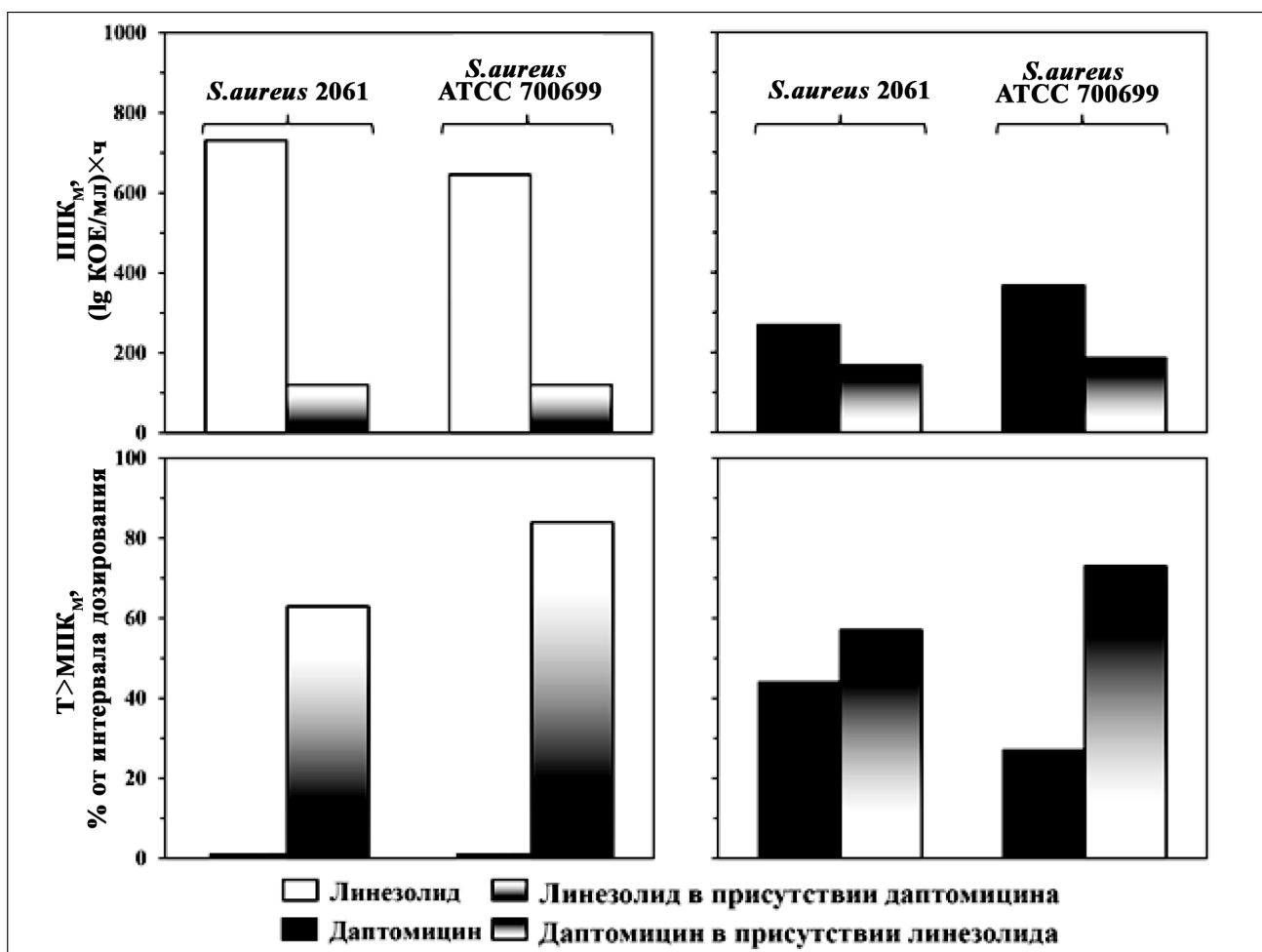


Рис. 2. Значения площади под кривой изменения численности антибиотикорезистентных мутантов *S. aureus* в пределах 120 ч и соответствующие значения $T > \text{МПК}_M$ при моделировании режимов моно- и комбинированной терапии линезолидом и даптомицином.

монотерапии линезолидом происходило неуклонное возрастание численности линезолидорезистентных мутантов и обогащение популяции штаммов *S. aureus* 2061 и ATCC 700699 резистентными клетками в конце эксперимента — до 8,7 и 8 lg КОЕ/мл, соответственно. Под влиянием даптомицина численность линезолидорезистентных к нему клеток *S. aureus* 2061 и *S. aureus* ATCC 700699 снижалась до уровня порога чувствительности (1 lg КОЕ/мл). При моделировании режимов монотерапии даптомицином селекция даптомицинорезистентных мутантов тех же штаммов была выражена слабее — до 2,3 lg КОЕ/мл (*S. aureus* 2061) и 5,8 lg КОЕ/мл (*S. aureus* ATCC 700699). Под влиянием линезолида такая селекция подавлялась почти полностью.

С целью выявления взаимосвязи между изменениями значений МПК_M антибиотиков под влиянием друг друга и их антимутантной эффективностью сопоставили значения ППК_M со временем, в течение которого моделируемая концентрация антибиотика превышает МПК_M

($T > \text{МПК}_M$) при моно- и комбинированном применении линезолида и даптомицина. Как видно на рис. 2, применительно к обоим штаммам *S. aureus* снижение значений ППК_M в результате комбинированной терапии линезолидом и даптомицином прямо связано с возрастанием $T > \text{МПК}_M$. При этом заметен больший защитный эффект даптомицина в отношении селекции линезолидорезистентных стафилококков по сравнению с эффектом линезолида на селекцию даптомицинорезистентных клеток также удалось объяснить более значительными изменениями $T > \text{МПК}_M$. В первом случае — от 0 до 63% интервала дозирования (*S. aureus* 2061) или от 0 до 84% (*S. aureus* ATCC 700699), во втором — от 27 до 73% интервала дозирования (*S. aureus* ATCC 700699) и от 44 до 57% (*S. aureus* 2061).

Обсуждение

При определении значений МПК_M линезолида и даптомицина применяемых в комбинации, соотношение концентраций препаратов (1:2) соответствовало отношению моделируемых значений их

ПФК₂₄ в фармакодинамических экспериментах. Значения МПК_М антибиотиков снижались под влиянием друг друга. Комбинация линезолида с даптомицином обеспечивала полное подавление роста линезолидорезистентных клеток *S.aureus*, наблюдаемое при монотерапии линезолидом. Антимутантная эффективность комбинации антибиотиков в отношении даптомицинорезистентных мутантов *S.aureus* была сравнима с таковой при монотерапии даптомицином (*S.aureus* 2061) или превосходила её (*S.aureus* ATCC 700699). Установлено, что антимутантный эффект сочетанного применения линезолида с даптомицином обусловлен возрастанием значений $T > \text{МПК}_M$, которые, в свою очередь, обусловлены снижением МПК_М антибиотиков под влиянием друг друга. Например, предотвращение развития резистентности к линезолиду происходило на фоне выраженного изменения $T > \text{МПК}_M$ линезолида в присутствии даптомицина (с 0 до 63–84% от интервала дозирования, в зависимости от штамма стафилококка). Аналогичный антимутантный эффект на линезолидорезистентную субпопуляцию *S.aureus*, связанный с резким повышением значений $T > \text{МПК}_M$ линезолида, наблюдался у комбинаций линезолида с рифампицином [13] или гентамицином [14]. Ситуация с даптомицинорезистентными мутантами в комбинированных режимах выглядела менее однозначно. При воздействии на клетки клинического штамма *S.aureus*, понижение МПК_М даптомицина приводило лишь к незначительному возрастанию $T > \text{МПК}_M$ (13%) и, как следствие, к отсутствию различий в антимутантном эффекте комбинации даптомицина с линезолидом и даптомицина, вводимого в режиме монотерапии. Вместе с тем, относительно низкая численность даптомицинорезистентных мутантов *S.aureus* 2061 во всех экспериментах с применением даптомицина указывает на

наличие собственной антимутантной активности липопептида. Аналогичное наблюдение было сделано и в работе по изучению фармакодинамического взаимодействия линезолида и гентамицина, когда антимутантный эффект аминогликозида в терапевтической дозе был соизмерим с эффектом его комбинации с линезолидом [14]. Применительно к коллекционному штамму *S.aureus* ATCC 700699 комбинированная терапия характеризовалась протективным эффектом как в отношении линезолидо-, так и даптомицинорезистентных мутантов, отчётливо демонстрируя взаимосвязь с резким возрастанием значений $T > \text{МПК}_M$ обоих антибиотиков под действием друг друга.

Заключение

При моделировании фармакокинетики линезолида и даптомицина в динамической системе *in vitro* была подтверждена возможность прогнозирования антимутантных свойств комбинации антибиотиков по значениям МПК_М, определяемым в присутствии друг друга. Соотношение концентраций линезолида и даптомицина при определении их МПК_М соответствовало отношению моделируемых значений ПФК₂₄ антибиотиков. Установлено, что полное или частичное подавление роста антибиотикорезистентных мутантов золотистого стафилококка происходит на фоне снижения значений МПК_М (повышения $T > \text{МПК}_M$) линезолида и даптомицина при комбинированной терапии. Полученные результаты подтверждают возможность прогнозирования антимутантной эффективности комбинированной терапии.

Источник финансирования. Исследование проведено благодаря финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ, соглашение № 18-15-00433).

ЛИТЕРАТУРА

1. Firsov A.A., Vostrov S.N., Lubenko I.Y., Drlica K., Portnoy Y.A., Zinner S.H. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1604–1613.
2. Firsov A.A., Golikova M.V., Strukova E.N., Portnoy Y.A., Romanov A.V., Edelstein M.V. et al. *In vitro* resistance studies with bacteria that exhibit low mutation frequencies: prediction of «antimutant» linezolid concentrations using a mixed inoculum containing both susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59: 1014–1019.
3. Firsov A.A., Alieva K.N., Strukova E.N., Golikova M.V., Portnoy Y.A., Dovzhenko S.A. et al. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to linezolid in an *in vitro* dynamic model. J Antimicrob Chemother 2017; 72: 3100–3107.
4. Tsioufas S., Gold H.S., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Wennersten C., Venkataraman L. et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001; 358: 207–208.
5. Wilson P., Andrews J.A., Charlesworth R., Walesby R., Singer M., Farrell D.J. et al. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 186–188.
6. Meka V.G., Pillai S.K., Sakoulas G., Wennersten C., Venkataraman L., DeGirolami P.C. et al. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. J Infect Dis 2004; 190: 311–317.
7. Gales A.C., Sader H.S., Andrade S.S., Lutz L., Machado A., Barth A.L. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 300–302.
8. Hentschke M., Saager B., Horstkotte M.A., Scherpe S., Wolters M., Kabisch H. et al. Emergence of linezolid resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain. Infection 2008; 36: 85–87.
9. Locke J.B., Hilgers M., Shaw K.J. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 5275–5278.
10. Yoshida K., Shoji H., Hanaki H., Yanagisawa C., Ikeda-Dantsuji Y., Fukuchi K. et al. Linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated after long-term, repeated use of linezolid. J Infect Chemother 2009; 15: 417–419.
11. Hill R.L., Kearns A.M., Nash J., North S.E., Pike R., Newson T. et al. Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 442–445.
12. Ikeda-Dantsuji Y., Hanaki H., Nakae T., Takesue Y., Tomono K., Honda J. et al. Emergence of linezolid-resistant mutants in a susceptible-cell population of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2466–2468.
13. Golikova M.V., Strukova E.N., Portnoy Y.A., Dovzhenko S.A., Kobrin M.B., Zinner S.H. et al. Pharmacokinetically-based prediction of the effects of antibiotic combinations on resistant *Staphylococcus aureus* mutants: *in vitro* model studies with linezolid and rifampicin. J Chemother 2017; 29: 267–273.
14. Zinner S.H., Golikova M.V., Strukova E.N., Portnoy Y.A., Firsov A.A. Predicting antibiotic combination effects on the selection of resistant *Staphylococcus aureus*: *In vitro* model studies with linezolid and gentamicin. Int J Antimicrob Agents 2018; 52: 854–860.

15. Aktas G., Derbentli S. *In vitro* activity of daptomycin combined with dalbavancin and linezolid, and dalbavancin with linezolid against MRSA strains. J Antimicrob Chemother 2017; 72: 441–443.
16. Hanberger H., Nilsson L.E., Maller R., Isaksson B. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca²⁺ and albumin on these drugs. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1710–1716.
17. Алиева К.Н., Струкова Е.Н., Голикова М.В., Портной Ю.А., Фирсов А.А. Зависимая от концентрации антибиотика селекция линезолидоустойчивых стафилококков в динамической системе *in vitro*. Антибиотики и химиотерапия. — 2016. — Т. 61. — № 9–10. — С. 28–32. / Alieva K.N., Strukova E.N., Golikova M.V., Portnoy Y.A., Firsov A.A. Zavisimaya ot koncentraciy antibiotika selekciya linezolidoustoichivyyh stafilokokkov v dinamicheskoy sisteme *in vitro*. Antibiotiki I Khimioter 2016; 61 (9–10): 28–32. [in Russian]
18. Moellering R.C. Jr. A novel antimicrobial agent joins the battle against resistant bacteria. Ann Intern Med 1999; 130: 155–157.
19. Stalker D.J., Jungbluth G.L. Clinical pharmacokinetics of linezolid, a novel oxazolidinone antibacterial. Clin Pharmacokinet 2003; 42: 1129–1140.
20. Dvorchik B.H., Brazier D., DeBruin M.F., Arbeit R.D. Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1318–1323.
21. Blaser J., Stone B.B., Zinner S.H. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units. J Antimicrob Chemother 1985; 15 (Suppl A): 131–137.
22. Smirnova M.V., Vostrov S.N., Strukova E.N., Dovzhenko S.A., Kobrin M.B., Portnoy Y.A. et al. The impact of duration of antibiotic exposure on bacterial resistance predictions using *in vitro* dynamic models. J Antimicrob Chemother 2009; 64: 815–820.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Алиева Камилла Натиговна — м. н. с., лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Голикова Мария Владимировна — к. б. н., с. н. с., лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Портной Юрий Абрамович — с. н. с., лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Фирсов Александр Алексеевич — чл.-корр. РАН, профессор, д. б. н., заведующий лабораторией фармакокинетики и фармакодинамики, научный руководитель, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Пробиотические и биотерапевтические свойства танназопозитивного штамма *Lactobacillus plantarum* MTCC 2621

*Л. Б. ОРЯБИНСКАЯ¹, Д. Б. ПРАСАННА², Л. Н. ЛАЗАРЕНКО³

¹ Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт им. Игоря Сикорского», Киев, Украина

² Национальный технологический институт Карнатака, Сурат-Бангалор, Индия

³ Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАНУ, Киев, Украина

Probiotic and Biotherapeutic Properties of Tannase Positive *Lactobacillus plantarum* MTCC 2621 Strain

*L. B. ORIABINSKA¹, D. B. PRASANNA², L. M. LAZARENKO³

¹ National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Kyiv, Ukraine

² National Institute of Technology Karnataka, Surathkal Mangalore, India

³ D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, Kyiv, Ukraine

Представлены данные о пробиотических свойствах штамма *Lactobacillus plantarum* MTCC 2621, полученного из коллекции микроорганизмов и банка генов Института микробных технологий Индии. Отличительной особенностью штамма является его способность продуцировать фермент танназу, с которым связаны антиоксидантные свойства культуры. Показано, что *L. plantarum* MTCC 2621 проявляет антагонизм к грамположительным и грамотрицательным бактериям, а также дрожжевым грибам. Установлена его высокая потенциальная способность к адгезии (ИАМ — $7,10 \pm 0,39$) и избирательная резистентность к широкому кругу антибиотиков (оксациллину, бензилпенициллину, гентамицину, канамицину, энрофлоксацину, полимиксину С и полимиксину М). В серии доклинических исследований выявлена иммунологическая толерантность штамма, а также его способность стимулировать неспецифическую противирусную защиту и врождённый иммунитет организма за счёт активации синтеза интерферона I типа. Методом спектрально-динамического анализа показана потенциальная противоопухолевая активность *L. plantarum* MTCC 2621 в отношении ряда онкозаболеваний, таких как плоскоклеточный и ороговевающий рак шейки матки, миома матки и кистозный процесс.

Ключевые слова: пробиотики, лактобактерии, антиоксиданты, антибиотикорезистентность, адгезивность, иммунотропность, антиканцерогенность.

The article presents the data on the probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* MTCC 2621 strain obtained from the collection of microorganisms and the gene bank of the Institute of Microbial Technologies of India. The distinctive feature of the strain is its ability to produce tannase enzyme, which is connected with the antioxidant properties of the probiotic. It was shown that *L. plantarum* MTCC 2621 is antagonistic to Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as yeast. Its high potential for adhesion (IAM — 7.10 ± 0.39) and selective resistance to a wide range of antibiotics (oxacillin, benzylpenicillin, gentamicin, kanamycin, enrofloxacin, polymyxin C and polymyxin M) were established. The immunological tolerance of the strain as well as its ability to stimulate nonspecific antiviral defense and innate immune system of the organism due to the activation of the synthesis of type I interferon were revealed in series of preclinical studies. The method of spectral-dynamic analysis shows the potential antitumor activity of *L. plantarum* MTCC 2621 against such oncological diseases as squamous and keratinized cervical cancer, uterine myoma, and cystic process.

Keywords: probiotics, lactobacilli, antioxidants, antibiotic resistance, adhesiveness, immunotropy, anticarcinogenicity.

Введение

Большое количество заболеваний, связанных с окислительными повреждениями тканей организма диктует необходимость разработки инновационной линии современных биопрепаратов на основе пробиотических культур с антиоксидантными свойствами. Среди пробиотических микроорганизмов особое внимание заслуживают молочнокислые бактерии р. *Lactobacillus*. Высо-

кие биотерапевтические свойства лактобактерий позволяют использовать их как в качестве медицинских препаратов с ярко выраженной антагонистической активностью, так и в качестве ингредиентов в рецептуре функциональных пищевых продуктов [1, 2].

Особенностью штамма *Lactobacillus plantarum* MTCC 2621, полученного из коллекции микроорганизмов и банка генов Института микробных технологий Индии, является его способность расщеплять пищевые танины экзоферментом танназой [3, 4]. Танины являются самой распространённой группой растительных фенольных со-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 03056 Украина, Киев, пр. Победы, 37. Национальный технический университет им. Игоря Сикорского

единений. Они способны образовывать комплексы с макромолекулами, которые не подлежат пепервариванию. Это снижает пищевую ценность продуктов и приводит к расстройствам работы пищеварительного тракта [5, 6]. Основным продуктом ферментативного гидролиза галотанинов является глюкоза и галловая кислота. [7]. Последней присущи мощные антиоксидантные свойства и способность тормозить злокачественные опухолевые процессы [8]. В ряде работ сообщается о положительной биотерапевтической роли *L. plantarum* 2621. Показано, что среда, содержащая живые клетки *L. plantarum* 2621 и *Enterococcus faecium* RM11, приводила к ингибированию пролиферации колоний раковых клеток Сасо-2 [9]. Есть данные об участии пробиотика в восстановлении фертильности лабораторных животных с симптомом бактериального вагиноза, которая обеспечивалась торможением агглютинации сперматозоидов с клетками эпителия и *Escherichia coli* [10.]. Сообщается о способности *L. plantarum* 2621 положительно влиять на восстановление гистологии кишечника и печени после алкогольной интоксикации [11].

Цель работы — изучение общих пробиотических, иммунологических и биотерапевтических свойств *L. plantarum* 2621, которые являются базовыми для оценки производственной перспективности штамма.

Материал и методы

Культура. *L. plantarum* MTCC 2621 получена из коллекции микроорганизмов и банка генов (Microbial Type Culture Collection and Gene Bank, MTCC) Института микробных технологий (Institute of Microbial Technology, IMTECH), Индия. Штамм относится к танназопозитивной группе молочнокислых бактерий (МКБ). Культивирование штамма проводили при температуре 37°C на жидкой, полужидкой или плотной питательной среде MRS. Стерилизацию среды осуществляли при 0,5 МПа в течение 20 мин., pH среды до стерилизации составил 6,6–6,8; после стерилизации — 6,2–6,6. Хранение лактобактерий осуществляли при +4°C в бульоне MRS, а также в столбике в полужидкой среде MRS.

Антагонистическая активность. Антагонизм штамма *L. plantarum* 2621 определяли методом перпендикулярных штрихов на среде MRS [12, 13]. В качестве тест-культур использовали грамположительные и грамотрицательные бактерии и дрожжевые грибы из музея культур кафедры промышленной биотехнологии НТУУ «КПИ им. И. Сикорского». Чувствительность тест-культур оценивали по размерам зон задержки роста: 5–15 мм — малочувствительные; 15–20 мм — умеренно чувствительные; 20–30 мм — чувствительные; 30–40 мм — высокочувствительные.

Определение кислотообразования. Активность кислотообразования определяли в градусах Тернера титриметрическим методом [12].

Лизоцим-синтезирующая активность. Продукцию лизоцима определяли методом агаровых пластинок [14]. В качестве тест-культуры использовали лизоцимпозитивный штамм *Micrococcus lysodeikticus*.

Резистентность к антибиотикам. Исследование резистентности штамма *L. plantarum* 2621 к антибиотикам проводили дисковым методом (методом диффузии в агар). Результаты ус-

тойчивости культуры к антибиотикам оценивали по диаметру задержки её роста [15].

Адгезивная активность. Для изучения адгезивной активности штамма применяли развернутый метод на нативных эритроцитах человека с применением светлопольной микроскопии [16]. Определяли: средний показатель уровня адгезии (СПА), К% (% клеток, имеющих на поверхности лактобактерии), индекс адгезивности микроба (ИАМ). Степень адгезивности считали нулевой при СПА <1,0; низкой — от 1,0 до 1,99; средней — от 2,0 до 3,99 и высокой — >4,0. Микроорганизмы считали неадгезивными при ИАМ <1,75; низкоадгезивными — от 1,76 до 2,49; среднеадгезивными — от 2,50 до 3,99 и высокоадгезивными — >4,0.

Иммуномодулирующая активность. Объектом исследования была суспензия клеток суточной культуры штамма *L. plantarum* 2621 в концентрации 1×10^6 кл/мл. Исследование проводилось на интактных мышцах линии BALB/c, самках в возрасте 8 нед. Содержание и обращение с подопытными животными проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите прав позвоночных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных». Мыши получали композицию молочнокислых бактерий интрагастрально один раз в сутки в течение 7 дней в концентрации 1×10^6 кл/животное. Были сформированы две группы мышей: первая — получали композицию молочнокислых бактерий (12 мышей), вторая — контрольная — получали физиологический раствор (12 мышей). На 1-, 3-, 6- и 9-е сутки от начала введения препарата от декапитованных мышей, которые предварительно получали полную анестезию, отбирали кровь и перитонеальный экссудат.

Функциональную активность клеток фагоцитарной системы — макрофагов перитонеальной полости — оценивали, используя общепринятые методы исследования поглощающей и кислородозависимой бактерицидной активности. Определяли показатель фагоцитоза (ПФ), подсчитывая в поле зрения микроскопа число клеток, содержащих частицы латекса (в %); и фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество частиц латекса, которые поглощались фагоцитами (в усл. ед.).

Кислородзависимую бактерицидную активность фагоцитов исследовали в спонтанном и стимулированном тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) спектрофотометрическим методом. [17].

Поверхностные антигены Т- и В-лимфоцитов исследовали с помощью метода прямой иммунофлуоресценции. В работе использовали моноклональные антитела к CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD25+ антигенов (MACS, Miltenyi Biotec, Германия). Образцы анализировали с помощью метода проточной цитометрии. Анализ образцов проводили на цитофлуориметре FACStar Plus (Becton-Dickinson, США), согласно рекомендациям производителя.

Определение концентрации цитокинов интерферонов (ИФН- γ , ИФН- α) интерлейкинов (ИЛ) — ИЛ-17А и ИЛ-23 в сыворотке крови мышей проводили с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА). Постановку метода проводили, согласно рекомендациям производителя тест-систем (BenderMedSystems, Австрия). Концентрацию цитокинов в сыворотке крови выражали в пг/мл.

Все опыты проводили в трёх повторах с использованием соответствующих контролей в сыворотке крови.

Биотерапевтические свойства штамма определяли методом спектрально-динамического анализа (СДА). Запись спектрально-динамических характеристик (СДХ) штамма осуществлялась с помощью комплекса медицинского экспертного (КМЕ). КМЕ сертифицирован, имеет разрешение Минздрава Украины и прошёл комплекс испытаний в аттестованных медицинских учреждениях Украины и Европы, где была подтверждена эффективность его медицинского применения. Оценка потенциальных биотерапевтических свойств проводилась путём сопоставления СДХ штаммов с базами

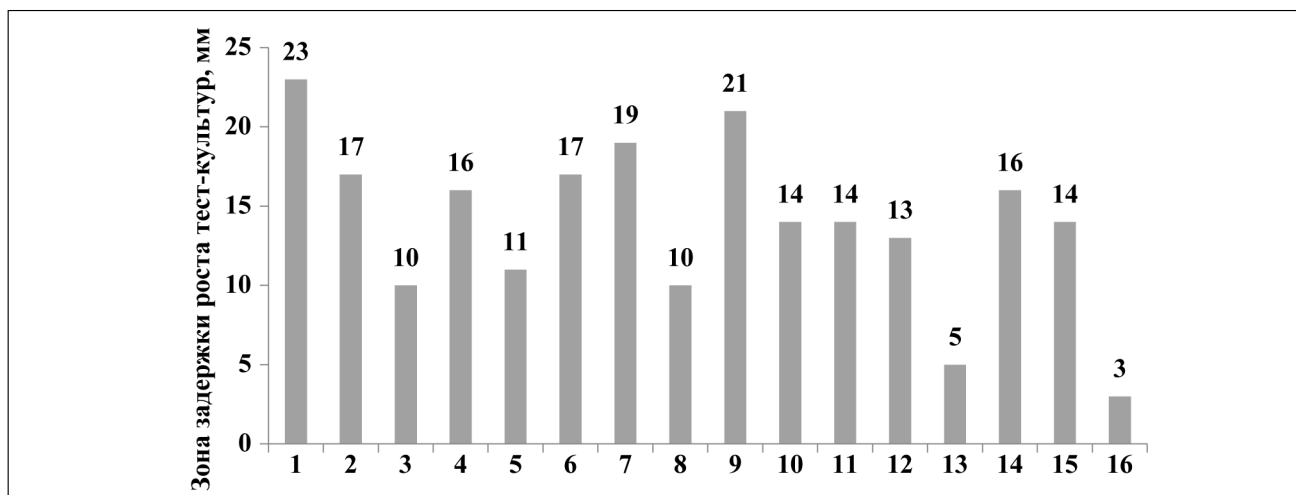


Рис. 1. Антагонизм молочнокислых бактерий в отношении тест-культур.

1 – *Sarcina flava*; 2 – *Staphylococcus citreus*; 3 – *Staphylococcus aureus*; 4 – *Bacillus mycoides*; 5 – *Bacillus subtilis*; 6 – *Bacillus cereus*; 7 – *Bacillus megaterium*; 8 – *Nocardia corallina*; 9 – *Escherichia coli*; 10 – *Acinetobacter calcoaceticus*; 11 – *Klebsiella pneumoniae*; 12 – *Brevibacterium linens*; 13 – *Rhodococcus maris*; 14 – *Candida lipolytica*; 15 – *Saccharomyces cerevisiae*; 16 – *Candida tropicalis*.

данных российской фирмы «Имедис», содержащей более 170 тыс. моделей организма человека в различных состояниях. Для записи СДХ штаммов использовались 24-суточные культуры. Проводили не менее 10 записей спектров. Обработка спектров происходила с помощью программы «Family Doctor» [18]. С целью оценки биотерапевтического потенциала *L. plantarum* 2621 среди полученной базы результатов были отобраны только такие модели организма, которые имели степень совпадения с СДХ молочнокислых бактерий 80% и более.

Статистическая обработка результатов. Все опыты были проведены с использованием соответствующих контролей и не менее, чем в трёх повторностях. Цифровые данные, полученные в результате исследований, обрабатывали с помощью статистических методов с использованием *t*-критерия Стьюдента для малых выборок на 95–99% уровне значимости. Расчёты проводили с использованием компьютерной программы Excel (Microsoft Office 2010).

Результаты исследования

Важнейшим критерием оценки перспективности пробиотических штаммов является их способность подавлять рост и размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Проведён анализ антагонистической активности *L. plantarum* 2621 в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также микроскопических грибов. Установлено, что штамм обладает способностью подавлять микроорганизмы из разных таксономических групп, но отличается по свойству задерживать рост микроорганизмов внутри групп. Данные, полученные в экспериментах на основании двух различных методик, находились в пределах погрешности эксперимента. Степень зон задержки роста тест-культур варьировала в пределах 5–23 мм для бактерий и 3–16 мм — для грибов (рис. 1).

Наибольшая чувствительность к метаболитам *L. plantarum* 2621 была обнаружена у *S. flava* (диаметр зоны задержки роста составлял 23 мм) и *E. coli*

(21 мм). Наибольшую устойчивость к действию пробиотика показали *Rh. maris* (5 мм) и дрожжеподобные грибы *C. tropicalis* (3 мм). Антагонистическая активность пробиотических микроорганизмов, как известно, реализуется за счёт различных механизмов. У лактобактерий, она чаще всего обусловлена синтезом молочной кислоты и антимикробных соединений [19]. Закисление среды продуктами метаболизма бактерий приводит к подавлению жизнеспособности патогенов, развивающихся в нейтральной или слабощелочной среде а также нарушает формирования биоплёнок патогенными и гнилостными плёнкообразующими бактериями [20]. Молочная кислота имеет и иное положительное влияние на организм человека. Она улучшает всасывание железа, кальция, витамина D, предупреждает всасывание аммиака и других токсичных метаболитов [21]. В связи с этим, была изучена динамика кислотообразования *L. plantarum* 2621 в процессе роста культуры в жидкой среде MRS. Полученные результаты представлены на рис. 2. Пробиотик показал высокий уровень кислотообразования, характерный для большинства микроорганизмов р. *Lactobacillus*. Интенсивное закисление среды происходило в течение первых двух суток культивирования и составило от 12° до 168°Т. После 48 ч культивирования резкого увеличения кислотности не наблюдалось. Через 72 ч она достигала 188°Т, а на 96-й час — 192°Т. Антагонизм молочнокислых бактерий часто коррелирует и с синтезом лизоцима. Фермент деградирует клеточные стенки бактерий, за счёт чего он принимает участие в создании неспецифического антибактериального барьера. Но, по результатам исследований, штамм *L. plantarum* 2621 не обнаружил способности продуцировать фермент.

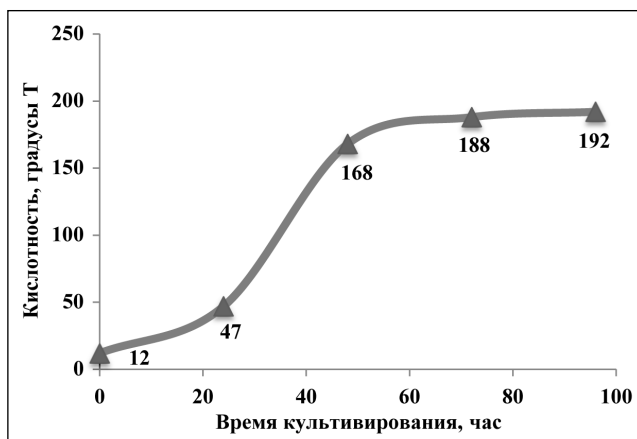


Рис. 2. Уровень кислотообразования штамма *L. plantarum* 2621.

Чувствительной средой для пробиотических культур являются отдельные участки желудочно-кишечного тракта, агрессивные условия которых, резко снижают их жизнеспособность. Однако синтез лактобактериями органических кислот и депортирование их за пределы клетки, обеспечивает клеткам высокие адаптационные преимущества к низким значениям pH желудочного сока. В предыдущих исследованиях нами сообщалось, что *L. plantarum* 2621 сохранял высокую выживаемость в присутствии желчных кислот в концентрациях 1–2% в течение 24 ч, при pH 2,5 в течение 3 ч. [3].

При подборе микроорганизмов для разработки пробиотических препаратов учитывают их способность адгезироваться на клетках эпителия слизистых оболочек макроорганизма. Это свойство особенно важно для пристеночных бактерии, которые путём конкурентного исключения уменьшают или ингибируют прикрепление патогенов к клеткам. Опираясь на данные литературы, изучение адгезии осуществляли на нативных эритроцитах развернутым методом с применением светлоразностной микроскопии. Показатели адгезивных свойств штамма *L. plantarum* 2621 представлены в табл. 1. Высокие показатели адгезии: (ИАМ — $7,10 \pm 0,39$ и СПА — 4,76), как известно, могут обеспечивать пробиотику активную конкуренцию

Таблица 1. Показатели адгезивных свойств штамма *L. plantarum* 2621

Показатели адгезивности	Значение
СПА	4,76
К, %	67,00
ИАМ	$7,10 \pm 0,39$

с патогенами за сайты связывания при колонизации на клетках эпителия макроорганизма.

Исключительным свойством молочнокислых бактерий является их избирательная устойчивость к действию антибиотиков. Учитывая это, определяли чувствительность *L. plantarum* 2621 к антибиотикам, которые имеют разные механизмы действия. Согласно представленным в табл. 2 данным, *L. plantarum* 2621 продемонстрировал высокую устойчивость к оксацилину, бензилпенициллину, гентамицину, канамицину, энрофлоксацину, полимиксину С и полимиксину М. Умеренно чувствительным штамм оказался к неомицину, офлоксацину и ципрофлоксацину. Однако к ампициллину, стрептомицину, эритромицину, линкомицину, тетрациклину, цефазолину и левомицетину штамм проявил чувствительность. Такая избирательность *L. plantarum* 2621 имеет свои преимущества. Антибиотикорезистентность придаёт клеткам пробиотика селективное доминирование во время антибиотикотерапии. В то же время чувствительность лактобактерий к некоторым антибиотикам исключает развитие септицемии у людей, имеющих иммунодефицитное состояние [22].

В последнее десятилетие пробиотики включены в классификацию иммуномодулирующих средств. Это связано с большой доказательной базой их участия в активации иммунных реакций и формировании иммунологической толерантности макроорганизма. Но высокие показатели пробиотической активности микроорганизмов не всегда коррелируют с их выраженной иммуномодулирующей способностью. И не всегда иммуномодулирующая способность является необходимым свойством пробиотических культур. Известно, что длительное и бесконтрольное употребление иммуномодуляторов может привести к иммунодепрессивному эффекту. Так, например, функциональные продукты, содержащие

Таблица 2. Чувствительность антибиотиков штамма *L. plantarum* 2621

Антибиотики	Зона угнетения роста, мм	Антибиотики	Зона угнетения роста, мм
Пенициллины		Полимиксины	
Ампициллин	$26,00 \pm 1,20$	Полимиксин С	$11,00 \pm 0,53$
Оксацилин	$7,00 \pm 0,19$	Полимиксин М	$9,00 \pm 0,27$
Бензилпенициллин	$10,00 \pm 0,38$	Макролиды	
Аминогликозиды		Эритромицин	$24,00 \pm 1,25$
Гентамицин	$11,00 \pm 0,21$	Линкозамиды	
Стрептомицин	$23,00 \pm 1,24$	Линкомицин	$26,00 \pm 1,22$
Неомицин	$14,00 \pm 0,81$	Тетрациклины	
Канамицин	$7,00 \pm 0,35$	Тетрациклин	$24,00 \pm 0,93$
Фторхинолоны		Цефалоспорины	
Офлоксацин	$16,00 \pm 0,79$	Цефазолин	$19,00 \pm 1,01$
Ципрофлоксацин	$18,00 \pm 0,76$	Левомицетин	$22,00 \pm 1,31$
Энрофлоксацин	$8,00 \pm 0,32$		

Таблица 3. Функциональная активность макрофагов перитонеальной полости после введения интактным мышам суспензии штамма *L.plantarum* 2621, $M \pm m$

Группа животных	Время после начала введения препарата, сут.	ПФ, %	ФЧ, усл. ед.	Показатели спонтанного НСТ-теста, оптическая плотность образца, $\lambda = 492$ нм
Интактные (контроль)	—	32,9 $\pm$ 1,1	2,9 $\pm$ 0,8	0,133 $\pm$ 0,014
Получали <i>L.plantarum</i> 2621	1-е	40,8 $\pm$ 2,0	3,3 $\pm$ 0,9	0,150 $\pm$ 0,023
	3-и	29,9 $\pm$ 5,7	3,0 $\pm$ 1,1	0,123 $\pm$ 0,012
	6-е	30,1 $\pm$ 3,1	2,7 $\pm$ 0,7	0,120 $\pm$ 0,078
	9-е	36,9 $\pm$ 2,7	3,2 $\pm$ 0,6	0,148 $\pm$ 0,087

Таблица 4. Количество лимфоцитов в селезёнке интактных мышей, которые получали *L.plantarum* 2621, $M \pm m$

Группа животных	Время после начала введения препарата, сут.	Относительное число клеток, %				CD4/CD8, усл. ед.
		CD3+	CD4+	CD8+	CD19+	
Интактные (контроль)	—	53,4 $\pm$ 2,9	32,0 $\pm$ 1,9	21,5 $\pm$ 2,9	8,2 $\pm$ 1,8	1,5 $\pm$ 0,8
Получали <i>L.plantarum</i> 2621	1-е	55,7 $\pm$ 4,0	37,3 $\pm$ 2,9	20,2 $\pm$ 1,9	6,3 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 0,2
	3-и	52,6 $\pm$ 2,6	32,2 $\pm$ 3,0	20,0 $\pm$ 2,1	8,6 $\pm$ 1,7	1,6 $\pm$ 0,9
	6-и	56,5 $\pm$ 2,9	35,8 $\pm$ 1,8	21,0 $\pm$ 2,0	7,4 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 0,2
	9-е	56,0 $\pm$ 4,1	34,0 $\pm$ 2,2	27,2 $\pm$ 3,0	16,1 $\pm$ 2,8	1,3 $\pm$ 0,8

Таблица 5. Содержание цитокинов в сыворотке крови интактных мышей, которые получали суспензию штамма *L.plantarum* 2621, $M \pm m$

Группа животных	Срок наблюдения, сут.	Содержание цитокинов, пкг/мл			
		ИФН- γ	ИФН- α	ИЛ-17А	ИЛ-23
Интактные (контроль)	—	5,2 $\pm$ 1,8	14,0 $\pm$ 2,2	87,0 $\pm$ 4,9	85,0 $\pm$ 6,9
Получали <i>L.plantarum</i> 2621	3	4,5 $\pm$ 1,9	27,5 $\pm$ 2,1*	60,1 $\pm$ 6,2	86,5 $\pm$ 7,9
	6	4,4 $\pm$ 2,1	27,0 $\pm$ 2,9*	54,2 $\pm$ 8,9	85,4 $\pm$ 10,4

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с показателями контроля.

микробные клетки, не должны проявлять значительные иммуностимулирующие свойства, поскольку их применение не предусматривает контроля со стороны специалистов [23]. Поэтому, изучение имунотропности пробиотиков является необходимой оценкой их биотерапевтической активности для оценки риска использования.

Иммуномодулирующую активность молочнокислых бактерий обычно связывают со способностью активировать фагоциты и продукцию иммунорегуляторных цитокинов. Результаты исследования влияния *L.plantarum* 2621 на активность клеток фагоцитарной системы представлены в табл. 3. Под воздействием пробиотика наблюдали незначительное повышение (ПФ), (ФЧ), а также показателей НСТ-теста макрофагов перитонеальной полости на 1- и 9-е сутки после введения пробиотика интактным мышам. Но эти изменения по сравнению с контролем оказались недостоверными.

Частичную оценку влияния препарата на показатели клеточного и гуморального иммунитета может дать определение фенотипического и количественного состава лимфоцитов селезёнки животных, получавших лактобактерии. Результаты, представленные в табл. 4, показывают, что количество CD3+ Т-лимфоцитов, CD4+ Т-хелперов, CD8+ Т-супрессоров и CD19+ В — лимфоцитов не изменялись в течение всего срока наблюдения. Отсутствие изменений в количественном составе Т- и В-клеток может свидетельствовать о недостатке их активации с последующим стимулированием иммунной системы. Не выяв-

лено достоверных изменений и в значении иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8), что, опосредовано, может указывать на иммунологическую толерантность пробиотика и его неспособность вызывать аллергические реакции у экспериментальных животных. Однако для подтверждения этого тезиса нужны дополнительные исследования.

С целью оценки иммуномодулирующего влияния штамма *L.plantarum* 2621 определяли продукцию под его влиянием иммунорегуляторных цитокинов, таких как: ИФН- γ , ИФН- α , ИЛ 17А и ИЛ-23 (табл. 5). После введения *L.plantarum* 2621 интактным мышам в сыворотке крови отмечали повышение содержания ИФН- α почти вдвое (27,0 $\pm$ 2,9 пкг/мл, в контроле — 14,0 $\pm$ 2,2 пкг/мл, $p < 0,05$). Активация интерфероногенеза может свидетельствовать о потенциальной возможности стимуляции под влиянием пробиотика неспецифической противирусной защиты и врождённого иммунитета организма. Вместе с тем, продукция ИФН- γ , а также ИЛ-17А и ИЛ-23 оставалась без изменений в течение всего срока наблюдения.

Способность *L.plantarum* 2621 метаболизировать мощный антиоксидант галловую кислоту в процессе ферментативного расщепления танинов даёт основание предполагать наличие у него противоопухолевой активности. Концепция онкопротекторного действия пробиотиков является относительно новой, мало изученной и перспективной. В связи с этим, было проведено исследование биотерапевтической активности *L.plantarum* 2621 в профилактике и лечении онкологиче-

ческих заболеваний женской половой системы методом спектрально-динамического анализа. Согласно полученным данным, штамм имел совпадение СДХ на уровне 80–90% с плоскоклеточным и ороговевающим раком шейки матки, миомой матки и кистозным процессом, что указывало на его противоопухолевый потенциал. Но полученные результаты требуют подтверждения клинических методов диагностики.

Заключение

Пробиотический танназопозитивный штамм *L.plantarum* 2621, проявляет антиоксидантные свойства, обусловленные образованием галловой кислоты как одного из продуктов ферментативного расщепления галлотанинов.

Установлена антагонистическая активность штамма в отношении бактерий и грибов, которая обеспечивалась высоким уровнем кислотообразования (192°Т). Высокий индекс адгезии, достигающий $7,10 \pm 0,39$, способен обеспечивать *L.plantarum* 2621 активную колонизацию на клетках эпителия кишечника и, возможно, более длительную персистенцию в организме хозяина. Штамм проявил выборочную резистентность к широкому кругу антибиотиков с разным меха-

низмом действия. Показана иммунологическая толерантность *L.plantarum* 2621 и его способность усиливать неспецифическую противовирусную активность за счёт активации синтеза интерферона 1 типа. После введения *L.plantarum* 2621 intactным мышам наблюдалось повышение в их сыворотке крови содержания ИФН- α до $27,0 \pm 2,9$ пг/мл против $14,0 \pm 2,2$ пг/мл в контроле.

Методом спектрально-динамического анализа установлена потенциальная противоопухолевая активность штамма в отношении некоторых онкологических заболеваний женской половой системы, таких как плоскоклеточный и ороговевающий рак шейки матки, миома матки и кистозный процесс.

Способность *L.plantarum* 2621 синтезировать антиоксидантные соединения и высокие показатели пробиотической и онкотерапевтической активностей указывают на перспективность для разработки на его основе пробиотического препарата или ингредиента для функциональных пищевых продуктов с антиоксидантными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл. Бюллетень сибирской медицины. — 2003. — № 4. — С. 50–58. / Glushanova N.A. Biologicheskie svoystva laktobatsill. Bjulleten' sibirskoj meditsiny 2003; 4: 50–58. [in Russian]
2. Шендеров Б.А., Манвелова М.А., Степанчук Е.Б., Скиба Н.Э. Пробиотики и функциональное питание. Антибиотики и химиотер. — 1997. — Т. 42. — № 7. — С. 30–34. / Shenderov B.A., Manvelova M.A., Stepanchuk E.B., Skiba N.E. Probiotiki i funktsional'noe pitanie. Antibiotiki i khimioter 1997; 42: 7: 30–34. [in Russian]
3. Belur, Oriabinska L., Khrokolo L., Dugan O. Optimization of tannase activity probiotic production in a bioreactor by response surface methodology. J Biotechnologia Acta. 2014; 7: 5: 62–70.
4. Bhandari P., Rishi P., Prabha V. Potential of Probiotic Lactobacillus plantarum 2621 for the Management of Infertility. Br Microbiol Res J 2014; 4: 12: 1585–1596.
5. Nip W.K., Burns E.E. Pigment characterization in grain sorghum I. Red varieties. Cereal Chem 1969; 46: 490–495.
6. Korpassy B. Tannins as hepatic carcinogens. Prog. Exp. Tumor Res 1961; 2: 245.
7. Mingshu L., Kai Y., Qiang H., Dongying J. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. J Basic Microbiol 2006; 46: 1: 68–84.
8. Purohit J.S., Dutta J.R., Nanda R.K., Banerjee R. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. Bioresour Technol 2006; 97: 795–801.
9. Thirabunyanon M. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. Biotechnol Lett 2009; 31: 571–576.
10. Bhandari P., Prabha V. Evaluation of pro-fertility effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* 2621 in a murine model Indian J Med Res 2015; 142: 1: 79–84.
11. Sumeha A., Indu P. K., Kanwaljit C., Praveen R. Efficiency of Double Layered Microencapsulated Probiotic to Modulate ProInflammatory Molecular Markers for the Management of Alcoholic Liver Disease. Mediators of Inflammation 2014; 11.
12. Постникова Е.А., Ефимов Б.А., Володин Н.Н., Кафарская Л.И. Поиск перспективных штаммов бифидобактерий и лактобацилл для разработки новых биопрепаратов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2004. — № 2. — С. 64–69. / Postnikova E.A., Efimov B.A., Volodin N.N., Kafarskaya L.I. Poisk perspektivnykh shtam-mov bifidobakterij i laktobatsill dlya razrabotki novykh biopreparatov. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2004; 2: 64–69. [in Russian]
13. Ермоленко Е.И., Исаков В.А., Ждан-Пушкина С.Х., Тец В.В. Количественная оценка антагонистической активности лактобацилл. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2004. — № 5. — С. 94–98. / Ermolenko E.I., Isakov V.A., Zhdan-Pushkina S.Kh., Tets V.V. Kolichestvennaya otsenka antagonistscheskoj aktivnosti laktobatsill. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2004; 5: 94–98. [in Russian]
14. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Тоом М.А. О способности лактобацилл микрофлоры человека продуцировать лизоцим Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1975; 8: 77–81. / Lentsner A.A., Lentsner Kh.P., Toom M.A. O sposobnosti laktobatsill mikroflory cheloveka produtsirovat' lizotsim Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. — 1975. — № 8. — С. 77–81. [in Russian]
15. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. Медицина 1982. — 496 с. / Navashin S.M., Fomina I.P. Ratsional'naya antibiotikoterapiya. Meditsina 1982; 496. [in Russian]
16. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. Лабораторное дело. — 1986. — № 4. — С. 210–212. / Brilis V.I., Brilene T.A., Lentsner Kh.P., Lentsner A.A. Metodika izucheniya adgezivnogo protsesssa mikroorganiz-mov. Laboratornoe delo 1986; 4: 210–212. [in Russian]
17. Модзольский А. Ф., Дяченко Н. С., Спивак Н. Я. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона. 1994. — 18 с. / Modzolevskij A. F., Dyachenko N. S., Spivak N. Ya. Sovremennye metody diagnostiki virusnykh respiratornykh infektsij i ikh terapii s ispol'zovaniem preparatov interferona 1994; 18. [in Russian]
18. Горчаков В. Ю., Старовойтова С. А., Горчакова Л. А., Оржельский И. В., Кушнерчук С. И., Переста М. М. и др. Использование «Комплекса медицинского экспертного» в решении проблем эндоэкологии человека Проблемы образования: Научн.-метод. сб. Институт инновационных технологий и содержания образования. — 2006. — № 49. — С. 73–76. / Gorchakov V. Ju., Starovojtova S. A., Gorchakova L. A., Orzhel'skij I. V., Kushnerchuk S. I., Peresta M. M. i dr. Ispol'zovanie «Kompleksa meditsinskogo ekspertnogo» v reshenii problem endoekologii cheloveka Problemy obrazovaniya: Nauchn.-metod. sb. Institut innovatsionnykh tekhnologii i soderzhaniya obrazovaniya 2006; 49: 73–76. [in Russian]
19. Стоянова Л. Г., Устюгова Е. А., Нетрусов А. И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: их разнообразие и свойства. Прикладная биохимия и микробиология. — 2012. — № 48 (3). — С. 259–275. / Stoyanova L. G., Ustyugova E. A., Netrusov A. I. Antimikrobnnye metabolity molochnokislykh bakterij: ikh raznoobrazie i svoystva. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya 2012; 48 (3): 259–275. [in Russian]

20. Miquel S, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front. Microbiol* 2016; 7: 592.
21. Симонова Е.В., Пономарева О.А. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека. *Сибирский медицинский журнал*. — 2008. — № 8. — С. 20–25. / *Simonova E.V., Ponomareva O.A. Rol' normal'noj mikroflory v podderzhanii zdorov'ya cheloveka. Sibirskij meditsinskij zhurnal* 2008; 8: 20–25. [in Russian]
22. Туплинська К.В., Орябінська Л.Б., Горчаков В.Ю. Побічна дія пробіотиків Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — 2012. — № 3. — С. 319–328.
23. Феценко Ю. И., Рекалова Е. М. Особенности современной иммуномодулирующей терапии. Астма та алергія. — 2013. — № 1. — С. 6–12. / *Feshchenko Yu. I., Rekalova E. M. Osobennosti sovremennoj immunomoduliruyushchej terapii. Astma ta alergiya*. 2013; 1: 6–12. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Орябинская Лариса Борисовна — к. б. н., доцент, кафедра промышленной биотехнологии, Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского», Киев, Украина

Прасанна Д. Белюр — адъюнкт-профессор, доктор философии, кафедра химической инженерии, Национальный технологический институт Карнатака, Сурат-Бангалор, Индия

Лазаренко Людмила Николаевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, отдел проблем интерферона и иммуномодуляторов, Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАНУ, Киев, Украина

Исследование хронической токсичности субстанции «Разветвлённый олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид» при орошении полости рта

С. В. БЕЛЯКОВ^{1,2}, С. А. КЕДИК^{1,2}, Д. О. ШАТАЛОВ^{1,2}, Д. А. АХМЕДОВА¹, П. Ю. ДЕМЕНЮК¹

¹ МИРЭА — Российский технологический университет, Москва

² АО «Институт фармацевтических технологий», Москва

Chronic Toxicity Study of the Substance «Branched oligo(Hexamethylene Guanidine) hydrochloride» During Oral Irrigation

*S. V. BELYAKOV^{1,2}, S. A. KEDIK^{1,2}, D. O. SHATALOV^{1,2}, D. A. AKHMEDOVA¹, P. Yu. DEMENYUK¹

¹ MIREA — Russian Technological University, Moscow

² ZAO "Institute of Pharmaceutical Technologies", Moscow

Проведено изучение хронической токсичности субстанции «Разветвлённый олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид» при многократном (в течение 28 дней) орошении полости рта крыс и кроликов. По ходу эксперимента проводили наблюдения за общим состоянием и поведенческой активностью животных, потреблением корма и воды, состоянием шерстного покрова, динамикой массы тела. Состояние гомеостаза оценивали с помощью функциональных, гематологических, биохимических и патоморфологических методов. По результатам исследований, установлено, что субстанция при орошении полости рта крыс в дозах 0,78 мг/кг и 15,6 мг/кг, а также кроликов в дозах 0,34 мг/кг и 6,8 мг/кг не вызывало существенных изменений в клиническом состоянии животных.

Ключевые слова: хроническая токсичность, ОГМГ-ГХ, терапевтическая доза, крысы, кролики, стоматит, гингивит, заболевания полости рта, патогены, олигоалкиленгуанидины.

The study of the chronic toxicity of the substance «Branched oligo(hexamethylene guanidine) hydrochloride» was carried out with repeated (within 28 days) irrigation of the oral cavity of rats and rabbits. During the experiment, observations were made of the general condition and behavioral activity of animals, feed and water consumption, coat condition, and body weight dynamics. The state of homeostasis was evaluated using functional, hematological, biochemical and pathomorphological methods. According to research results, it was found that the substance during irrigation of the oral cavity of rats at doses of 0.78 mg/kg and 15.6 mg/kg, as well as rabbits at doses of 0.34 mg/kg and 6.8 mg/kg, did not cause significant changes in the clinical condition of animals.

Keywords: chronic toxicity, OHMG-GC, therapeutic dose, rats, rabbits, stomatitis, gingivitis, oral diseases, pathogens, oligoalkylene guanidines.

Введение

В настоящее время из-за активного роста антибиотикорезистентности у микроорганизмов и, как следствие, увеличения повсеместных острых и хронических заболеваний полости рта и глотки, возрос интерес к разработке новых антисептических препаратов [1–3]. Производные гуанидина уже долгое время используются в качестве активных веществ в антисептических и противомикробных препаратах благодаря их широкому спектру антимикробного действия, низкой токсичности и экономической доступности [4]. Препараты на их основе сохраняют свою активность в широком диапазоне условий внешней среды. Так, производное гуанидина, субстанция «Раз-

ветвлённый олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид» (ОГМГ-ГХ), за счёт широкого спектра антимикробной активности к таким микроорганизмам, как: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinomyces pyogenes*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces israelii*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus micros*, *Finnegoldia magna*, *Veillonella parvula*, *Prevotella disiens* и *Fusobacterium nucleatum* является перспективным синтетическим биоцидным соединением и может быть использована в медицинской практике для лечения стоматита, гингивита, тонзиллита, фарингита, ларингита и других стоматологических заболеваний [5–6].

Необходимым этапом разработки субстанции «ОГМГ-ГХ» для получения регистрационного свидетельства на лекарственное средство является доклиническая оценка её безопасности. Таким образом, цель данной работы заключалась в подтверждении действия субстанции «ОГМГ-ГХ» при

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: e-mail: s.v_belyakov@mail.ru

её многократном применении, выявлении наиболее чувствительных органов и систем организма.

Материал и методы

Исследуемым соединением является синтезируемая микрофлюидным способом фармацевтическая субстанция «Разветвлённый олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид» (полученная от ФГБОУ ВО «РТУ МИРЭА», Россия).

Эксперименты по изучению хронической токсичности «ОГМГ-ГХ» проводили на самцах и самках аутбредных крыс массой 150–200 г и кроликах породы советской шиншиллы массой 2–2,2 кг. Все животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и корму в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 [7].

Так как в клинической практике препарат на основе субстанции «ОГМГ-ГХ» планируется применять посредством орошения полости рта (местное применение), в данном исследовании животным распыляли указанную субстанцию в ротовую полость с помощью распылителя. Перед применением

субстанцию «ОГМГ-ГХ» разводили в воде для инъекций до необходимой концентрации: для крыс терапевтическая доза и двадцатикратная терапевтическая доза составляла 0,78 мг/кг и 15,6 мг/кг (коэффициент пересчёта — 6,5), для кроликов — 0,34 мг/кг и 6,8 мг/кг (коэффициент пересчёта — 14,7), соответственно. Контрольным животным вводили стерильный 0,9% раствор натрия хлорида. Все манипуляции с животными проводили, согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).

Субстанцию вводили крысам и кроликам 1 раз в день в течение 28 сут. Для исследования динамики развития возможной интоксикации часть крыс из каждой группы выводили из эксперимента через 15 и 29 дней от начала использования субстанции «ОГМГ-ГХ» с исследованием интегральных и физиологических показателей, исследованием крови и патоморфологическим исследованием. За оставшимися крысами («отставленные» группы) наблюдали ещё в течение 2 нед. После наблюдения их подвергали эвтана-

Таблица 1. Средние показатели клинического анализа крови крыс самцов/самок

Срок, сутки	Группа животных		
	Группа 1/2 (самцы/самки) контроль	Группа 3/4 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 0,78 мг/кг	Группа 5/6 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 15,6 мг/кг
Эритроциты (RBC), $10^{12}/л$			
Фон	8,1±0,19/7,8±0,33	8,4±0,30/8,0±0,19	8,4±0,30/7,9±0,13
15	8,6±0,25/7,5±0,20	8,2±0,18/7,7±0,35	8,2±0,18/8,1±0,28
29	9,8±0,13/8,6±0,19	8,9±0,26*/8,4±0,22	8,9±0,26*/8,7±0,16
43	8,2±0,46/7,4±0,16	8,2±0,26/7,2±0,59	8,2±0,26/8,2±0,34
Тромбоциты (PLT), $10^9/л$			
Фон	703,2±48,85/486,4±34,19	702,8±53,13/500,2±92,23	701,2±53,78/455,2±60,74
15	755,2±65,34/442,8±41,86	606,0±41,47/590,0±39,64	606,0±76,62/517,4±51,54
29	931,0±93,08/712,4±31,62	759,0±26,24/666,2±33,15	737,0±48,34/530,4±100,24
43	569,8±62,96/818,4±87,65	632,0±108,88/948,8±55,67	668,8±115,97/748,8±109,21
Гематокрит (HCT), %			
Фон	39,6±1,88/37,8±0,92	41,6±1,12/39,0±0,93	40,0±0,81/39,2±0,53
15	41,7±1,61/35,9±1,35	39,2±0,68/36,4±1,19	39,0±2,04/38,3±1,09
29	49,7±0,99/41,6±0,81	43,9±1,02*/41,6±0,74	45,1±0,55*/43,7±1,94
43	40,7±3,10/37,7±0,48	39,8±1,29/39,0±1,89	40,4±1,37/40,0±1,44
Гемоглобин (HGB), г/л			
Фон	161,0±7,11/151,2±3,07	153,6±5,45/151,4±3,63	157,6±3,57/151,4±2,32
15	163,0±4,53/151,0±5,36	161,0±2,03/153,4±3,88	156,4±6,37/159,2±3,35
29	179,8±2,01/165,0±2,12	169,2±3,14*/164,0±1,52	172,2±2,04*/170,8±2,27
43	155,6±7,69/150,4±2,06	154,8±4,93/145,4±5,79	155,2±5,08/161,2±5,45
Лейкоциты (WBC), $10^9/л$			
Фон	12,3±0,84/11,1±0,62	12,6±1,12/10,7±1,13	11,7±0,48/12,0±0,97
15	13,1±1,21/10,9±0,55	13,2±1,46/14,4±1,46	13,9±0,52/13,4±0,89
29	12,5±0,67/12,3±0,34	13,2±0,41/14,1±1,65	14,8±0,93/10,2±1,00
43	16,0±1,14/13,3±1,12	14,8±2,78/13,8±0,83	15,7±1,31/12,8±1,22
Лимфоциты (LYM), %			
Фон	66,3±4,59/68,0±4,04	69,5±2,16/68,6±1,87	68,5±1,72/63,2±5,68
15	63,7±4,53/67,6±1,54	66,7±3,12/73,3±1,99	70,7±4,04/72,0±3,36
29	70,9±1,62/71,8±1,41	73,6±1,86/71,3±3,79	70,9±3,57/63,6±3,77
43	63,2±4,72/69,1±3,28	59,3±8,96/71,1±1,45	71,2±0,22/67,4±2,88
Моноциты (MID), %			
Фон	10,1±0,83/9,8±0,80	9,4±1,17/9,9±1,81	10,5±0,96/10,2±1,89
15	10,7±1,38/12,0±0,75	10,1±0,53/8,2±0,53*	8,6±0,72/8,6±0,86*
29	9,4±0,44/9,1±0,58	9,1±0,59/9,2±0,72	9,4±0,85/9,9±0,52
43	10,5±1,15/11,3±1,21	9,2±1,35/9,7±0,39	9,4±0,43/10,1±0,61
Гранулоциты (GRAN), %			
Фон	23,6±4,52/22,2±3,39	21,1±2,09/21,5±3,02	20,9±0,92/25,6±6,15
15	25,6±3,24/20,5±1,37	23,2±3,10/18,5±1,65	20,7±3,36/19,4±2,61
29	19,7±1,52/19,1±1,22	17,3±1,52/18,8±3,17	19,7±2,75/26,5±3,47
43	24,1±3,27/19,6±2,08	31,4±8,90/19,3±1,25	19,5±0,30/22,7±2,35

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * — различие в сравнении с контрольной группой по *t*-критерию Стьюдента ($p<0,05$).

Таблица 2. Средние групповые показатели относительной массы внутренних органов кроликов самцов/самок

Срок, сутки	Группа животных		
	Группа 1/2 (самцы/самки) контроль	Группа 3/4 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 0,34 мг/кг	Группа 5/6 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 6,8 мг/кг
Печень	2,47±0,120/2,79±0,220	2,52±0,131/2,83±0,107	2,60±0,205/2,86±0,093
Почки	0,60±0,033/0,68±0,063	0,64±0,022/0,57±0,030	0,61±0,010/0,61±0,030
Селезёнка	0,04±0,003/0,03±0,003	0,05±0,001/0,04±0,001*	0,05±0,002/0,05±0,002*
Сердце	0,22±0,012/0,24±0,020	0,22±0,005/0,24±0,008	0,22±0,007/0,25±0,009
Тимус	0,13±0,010/0,15±0,014	0,12±0,005/0,15±0,012	0,14±0,002/0,12±0,007
Семенники/яичники	0,14±0,010/0,007±0,0009	0,14±0,002/0,008±0,0009	0,14±0,002/0,009±0,0004
Лёгкие	0,35±0,021/0,38±0,035	0,33±0,006/0,37±0,041	0,36±0,004/0,35±0,005
Головной мозг	0,28±0,023/0,32±0,015	0,28±0,013/0,29±0,019	0,29±0,005/0,29±0,009
Надпочечники	0,011±0,0010/0,010±0,001	0,010±0,0010/0,009±0,0000	0,012±0,000/0,007±0,0010

Таблица 3. Средние показатели активности ферментов крови и содержания билирубина крыс самцов/самок

Срок, сутки	Группа животных		
	Группа 1/2 (самцы/самки) контроль	Группа 3/4 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 0,78 мг/кг	Группа 5/6 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 15,6 мг/кг
АЛТ, Е/л			
15	32,8±5,20/33,4±2,44	39,2±2,84/31,2±3,86	39,5±5,40/44,7±3,25*
29	38,6±3,27/37,8±2,48	38,7±3,13/42,4±3,41	45,5±2,76/45,7±3,30
43	40,6±3,88/47,2±2,75	49,0±4,32/45,7±3,30	51,2±7,07/40,2±3,29
АСТ, Е/л			
15	214,2±16,37/209,7±8,28	228,5±27,98/282,6±34,98	232,0±18,62/282,1±24,36*
29	216,7±22,16/229,5±27,37	232,5±16,65/243,2±23,43	253,6±36,82/214,9±36,57
43	215,0±20,95/219,8±21,31	223,0±17,27/217,2±11,52	211,0±14,55/207,4±8,78
ЩФ, Е/л			
15	368,9±17,46/254,3±15,38	368,5±19,65/234,9±24,37	362,6±28,20/283,5±7,81
29	368,6±17,43/257,8±23,57	343,8±28,53/200,5±9,14	306,5±30,94/291,0±33,92
43	319,3±24,08/298,0±23,26	307,3±13,25/264,6±22,98	316,8±24,71/283,2±18,53
Общий билирубин, мкмоль/л			
15	2,1±0,17/2,4±0,38	2,6±0,41/2,2±0,20	2,4±0,23/2,3±0,24
29	1,9±0,13/2,4±0,50	1,8±0,27/2,1±0,10	2,1±0,10/2,4±0,39
43	2,0±0,18/1,9±0,29	1,9±0,29/2,3±0,34	2,4±0,28/2,3±0,34

зии с обследованием в том же объёме, что и животных, забитых сразу после окончания введения тестируемого средства. Общий срок наблюдения для крыс составил 43 сут., для кроликов — 29 сут.

Местно-раздражающее действие субстанции «ОГМГ-ГХ» изучали на крысах и кроликах в хроническом эксперименте при орошении полости рта. Оценку проводили визуально и по анализу цитогистоархитектоники мест введения.

Объём и продолжительность исследования, набор использованных методов, регистрируемых параметров и другие условия проведения исследования регламентировались соответствующими Руководствами, рекомендованными Минздравом РФ и правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики») [8–10].

Результаты исследований подвергали статистической обработке в программе Microsoft Excel 2016, достоверность результатов оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

По результатам исследования, установлено, что после орошения ротовой полости субстанцией «ОГМГ-ГХ» на протяжении всего опыта гибели животных не зарегистрировано. Не выявлено существенных различий в потреблении воды и пищи. Препарат не вызывал изменений в поведенческих реакциях, реакции на внешние раздражители, а также нарушений в двигатель-

ной активности животных. Относительная масса внутренних органов крыс, которым применяли препарат, существенно не отличалась от контроля.

В течение 2 нед. применения субстанции «ОГМГ-ГХ» у крыс-самок снизилось количество моноцитов, после 28 дней произошло снижение количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита в крови крыс-самцов по сравнению с животными в контрольной группе. Однако по отношению к фоновым данным эти показатели значимо не изменились. Статистический анализ клинических показателей крови после отставленного периода не выявил отклонений опытных групп от контрольных группы животных (табл. 1). По результатам клинического анализа крови кроликов не было обнаружено отклонений опытных групп по отношению к контрольным.

У кроликов-самок выявлено увеличение массы селезёнки при введении субстанции «ОГМГ-ГХ» как в терапевтической дозе, так и в дозе превышающую её в 20 раз (табл. 2).

Применение субстанции «ОГМГ-ГХ» не оказывает влияние на гематологические показатели крови при длительном применении.

Таблица 4. Средние показатели белкового обмена кроликов самцов/самок

Срок, сутки	Группа животных		
	Группа 1/2 (самцы/самки) контроль	Группа 3/4 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 0,34 мг/кг	Группа 5/6 (самцы/самки) ОГМГ-ГХ, 6,8 мг/кг
Общий белок, г/л			
Фон	66,5±3,00/68,3±1,99	66,4±2,25/68,1±2,62	68,4±1,99/67,2±2,66
29	69,7±0,33/69,5±0,41	69,7±0,78/69,4±0,71	70,7±3,65/67,3±1,89
Креатинин, мкмоль/л			
Фон	135,7±5,06/131,8±8,05	139,5±4,64/137,6±5,90	137,4±3,54/136,8±4,25
29	132,9±2,39/134,7±2,58	142,2±4,47/138,7±1,34	139,1±3,09/136,8±4,25
Мочевина, ммоль/л			
Фон	9,9±0,50/9,9±0,34	10,2±0,57/9,9±0,64	10,1±0,44/10,0±0,41
29	9,8±0,49/9,3±0,14	11,4±0,38*/10,5±0,49	11,5±0,28*/11,5±0,38*

При статистической обработке биохимических показателей крови и мочи животных существенных изменений отмечено не было, однако было установлено, что у крыс-самок, получавших двадцатикратную дозу субстанции «ОГМГ-ГХ», повышено содержание печёночных ферментов (АЛТ и АСТ), у кроликов (самцов и самок) увеличено количество мочевины. Тем не менее, эти данные не превышают референтных показателей для данных видов животных (табл. 3–4).

При вскрытии животных после орошения полости рта субстанцией «ОГМГ-ГХ» в терапевтической дозе не было зафиксировано каких-либо проявлений интоксикации. Однако при использовании двадцатикратной терапевтической дозы в течение 28 дней было выявлено увеличение межклеточного пространства и изменение формы клеток в печени и лёгких у крыс; в печени, лёгких, почках и селезёнке — у кроликов. Данные изменения носили обратимый характер.

Местно-раздражающего действия при орошении полости рта субстанцией «ОГМГ-ГХ» в мак-

роскопическом и микроскопическом исследовании не выявлено.

Таким образом, на основании проведённых исследований можно сделать вывод о том, что многократное использование субстанции «Разветвленный олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид» не оказывает повреждающего действия на организм животных в дозах, предполагаемых для клинического применения.

Работа выполнялась в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, департамент Биотехнологии и Промышленной Фармации (БТиПФ).

Исследование финансировалось Министерством науки и высшего образования РФ, грант № 14.N08.12.0095.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шульпекова Ю.А. Воспалительные заболевания полости рта и глотки. Медицина неотложных состояний. — 2007. — № 4 (11). — С. 101–105. / *Shulpekova Yu.A. Vospalitel'nye zaboлевaniya polosti rta i glotki. Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy* 2007; 4 (11): 101–105. [in Russian]
2. Jin L.J., Lamster I.B., Greenspan J.S., Pitts N.B., Scully C., Warnakulasuriya S. Global burden of oral diseases: emerging concepts management and interplay with systemic health. *Oral Diseases* 2016; 22: 609–619. doi:10.1111/odi.12428
3. Kholy K.E., Genco R.J., Van Dyke T.E. Oral infections and cardiovascular disease // *Trends in Endocrinology and Metabolism* June 2015; 26: 6: 315–321.
4. Кедик С.А., Седышев И.П., Панов А.В. Разветвленные олигомеры на основе производного гуанидина и дезинфицирующий агент, содержащий указанные олигомеры (варианты), WO/2012/082009 PCT/RU2011/000536, 21.06.2012. / *Kedik S. A., Sedyshev I. P., Panov A. V. Razvetvlennye oligomery na osnove proizvodnogo guanidina i dezinfitsiruyushchij agent, soderzhashchij ukazannye oligomery (varianty)*, WO/2012/082009 PCT/RU2011/000536, 21.06.2012. [in Russian]
5. Шаталов Д.О., Кедик С.А., Айдакова А.В., Ворошилова Е.А., Михайленко Е.Н., Беляков С.В. и соавт. Заболевания полости рта: методы лечения и перспективы создания эффективных лекарственных препаратов. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. — 2018. — Т. 21. — № 3. — С. 11–16. / *Shatalov D.O., Kedik S.A., Aidakova A.V., Voroshilova E.A., Mikhajlenko E.N., Belyakov S.V. i soavt. Zaboлевaniya polosti rta: metody lecheniya i perspektivy sozdaniya effektivnykh lekarstvennykh preparatov. Voprosy biologicheskoy meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii* 2018; 21: 3: 11–16. [in Russian]
6. Shatalov D. O., Kedik S. A., Panov A. V., Zhavoronok E. S., Aydakova A. V., Kovalenko A. V. et al. Antimicrobial Activity Of Branched Oligo (Hexamethyleneguanidine) Hydrochloride On Oral Pathogens. *Russian Open Medical Journal* 2018; 7: e0309.
7. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 года, № 51). / *Sanitarno-epidemiologicheskie pravila SP 2.2.1.3218-14 «Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k ustroystvu, oborudovaniyu i soderzhaniju eksperimental'no-biologicheskikh klinik (vivariyev)» (utv. Postanovleniem Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF ot 29 avgusta 2014 goda, № 51)*. [in Russian]
8. ГОСТ Р 56701-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств». / *GOST R 56701-2015 «Lekarstvennye sredstva dlya meditsinskogo primeneniya. Rukovodstvo po planirovaniyu doklinicheskikh issledovanij bezopasnosti s tsel'ju posleduyushchego provedeniya klinicheskikh issledovanij i registratsii lekarstvennykh sredstv»*. [in Russian]
9. Руководство Р 1.2.3156-13 «Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека», М.: 2014. / *Rukovodstvo R 1.2.3156-13 «Otsenka toksichnosti i opasnosti khimicheskikh veshchestv i ikh smesey dlya zdorov'ya cheloveka»*, М.: 2014. [in Russian]
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. — 944 с. / *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya*. М.: Grif i K, 2012; 944. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Беляков С. В. — аспирант кафедры Биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», технолог АО «Институт фармацевтических технологий», Москва

Кедик С. А. — д. т. н., профессор, зав. кафедрой Биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Генеральный директор АО «Институт фармацевтических технологий», Москва

Шаталов Д. О. — к. фарм. н., доцент кафедры Биотехнологии и промышленной фармации Федерального государст-

венного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», заместитель Генерального директора АО «Институт фармацевтических технологий», Москва

Ахмедова Д. А. — студентка кафедры Биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Деменюк П. Ю. — студент кафедры Биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Менингит: трудности диагностики, клиника и лечение

*В. И. СОКОЛОВА¹, Д. А. СЫЧЁВ¹, Е. И. ВАСИЛЬЕВА², Е. А. СЕРЁДКИН²

¹ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

² НУЗ Научный клинический центр ОАО «Российские железные дороги», Москва

Meningitis: Difficulties in Diagnosis, Clinical Characteristics, and Treatment

*V. I. SOKOLOVA¹, D. A. SYCHEV¹, E. I. VASILIEVA², E. A. SEREDKIN²

¹ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow

² Scientific Clinical Center of Jsc Russian Railways, Moscow

В статье представлен клинический пример трудности диагностики менингита у больной с невыраженным менингеальным симптомокомплексом. Среди разнообразных диагностических и лечебных подходов, есть ключевые методы исследования, которые позволили выявить природу инфекционного процесса, поставить диагноз вторичного отогенного бактериального пневмококкового менингита и провести этиотропную антибактериальную терапию. Анализ данного клинического случая показал, что тяжесть инфекционно-воспалительного процесса определялась не только возбудителем *Streptococcus pneumoniae*, но и имеющимся вторичным иммунодефицитным состоянием (сахарный диабет, протезы и др.). В связи с чем, существенное внимание уделялось не только коррекции гликемии, антимикробной, но и антиоксидантной терапии, что и обеспечило успех лечения.

Ключевые слова: бактериальный гнойный менингит, пневмококковый менингит, спинномозговая жидкость, маркеры воспаления, цитоз.

The article presents a clinical example of the difficulty in diagnosing meningitis in a patient with unexpressed meningeal symptom complex. Among various diagnostic and therapeutic approaches, there are key research methods that have made it possible to identify the nature of the infectious process, to diagnose secondary otogenic bacterial pneumococcal meningitis, and to conduct etiotropic antibiotic therapy. The analysis of this clinical case showed that the severity of the infectious and inflammatory process was determined not only by the causative agent of *Streptococcus pneumoniae*, but also by the existing secondary immunodeficiency state (diabetes mellitus, implants, etc.). In connection with this, significant attention was given not only to the correction of glycemia and antimicrobial therapy, but also to antioxidant therapy, which ensured success of the treatment.

Keywords: bacterial purulent meningitis, pneumococcal meningitis, cerebrospinal fluid, markers of inflammation, cytolysis.

Менингит — инфекционное заболевание, при котором воспалительный процесс локализуется преимущественно в оболочках мозга. Менингиты занимают 10-е место в мире среди причин смертности от инфекционных болезней. Менингиты могут быть первичными и вторичными. Первичные менингиты — самостоятельные заболевания, вторичные — возникают как осложнение общего или локального инфекционного процесса. По характеру воспаления, развивающемуся в оболочках мозга и по составу спинномозговой жидкости (СМЖ), отражающему этот процесс, менингиты разделяются на гнойные и серозные. Первичные менингиты относятся к воздушно-капельным инфекциям и проявляются в форме респираторной инфекции. Вторичные менингиты могут вызываться условно-патогенной аутофлорой, поэтому случаи менингита в семейных очагах — единич-

ные, спорадические, а групповые заболевания возможны только в коллективах (ясли, школа, детские сады, казармы, общежития и т. п.). Вторичные гнойные менингиты обычно возникают при наличии гнойного очага в организме. Они могут развиваться в результате непосредственного перехода инфекции из гнойных очагов, располагающихся вблизи оболочек мозга, например при наличии гнойного отита или гайморита, либо путём метастазирования из гнойных очагов, располагающихся в отдалении, например при абсцессах или бронхоэктазах лёгких [1, 2]. Этиология бактериальных менингитов разнообразна и, по данным десятилетнего наблюдения, соотношение основных возбудителей остаётся постоянным: преобладал менингококк (64,5%), далее следовали пневмококк (15,9%), гемофильная палочка типа b (6,7%), золотистый стафилококк (4,3%) и прочие возбудители (8,6%) [3]. Возбудителями вторичного гнойного менингита могут быть: *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Cryptococcus* spp. и др. [4–6]. В

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 125993 Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1. РМАНПО МЗ РФ

случаях, если менингит является осложнением хронического отита, необходимо учитывать возможность инфицирования и анаэробными микроорганизмами и бактериями сем. Enterobacteriaceae. Следует учитывать и проблему внутрибольничных (нозокомиальных) менингитов в нейрореанимационных отделениях неинфекционных стационаров. В этих случаях этиологическим агентом менингитов становятся грамположительные кокки, в том числе коагулазонегативный стафилококк (CoNS) и грамотрицательные бактерии, в частности *Acinetobacter baumannii*, обладающие из-за необходимости широкого использования антибактериальной терапии, способствующей селекции, полирезистентностью [7–9].

Наиболее значимыми этиологическими агентами неменингококковых гнойных бактериальных менингитов (НГБМ) являются *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* типа b. Средний показатель летальности по группе НГБМ в Российской Федерации за период 2005–2011 гг. составил 10,4%. При анализе случаев с летальным исходом было установлено, что показатели летальности имеют разное значение в зависимости от этиологии менингита. Средний показатель летальности при менингитах, вызванных пневмококком, составил 13,3%, а золотистым стафилококком — 11%. Наименьшим показателем летальности (3,9%) характеризовались менингиты, обусловленные гемофильной палочкой типа b [10, 11]. Среди переболевших менингококковой инфекцией и менингококковым менингитом, у 20% формировалась стойкая инвалидность [12]. По данным анализа 38-летнего опыта работы менингококковых отделений и ОРИТ ИКБ №2 г. Москвы, наиболее высокими остаются летальность и частота последствий при пневмококковом менингите (ПМ): 20–25 и 30% случаев, соответственно. При менингококковом менингите летальность составляла 3–5%. Удельный вес ПМ в РФ среди других гнойных менингитов составляет 9,5–26%, в г. Москве за период 2005–2011 гг. — от 10,4% до 21% [11, 12]. Менингит, вызванный *H. influenzae*, регистрируется у детей до 5 лет, в связи с применением вакцин число больных снизилось с 9,9% до 4,0% [13, 14].

За последние 5–7 лет повысилось качество оказания помощи больным с БГМ благодаря разработке и внедрению новых методов исследования спинномозговой жидкости (СМЖ): полимеразной цепной реакции (ПЦР), уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и её изоформ, фракций белка, pH, pO_2 и pCO_2 и исследования иммунного статуса. Важную роль играют методы экспресс-диагностики (коагутинация, иммуноферментный, иммунохроматографический и др.), позволяющие выявить антигены возбудителей в ликворе больных. Особенно перспективным является метод латекс-агглютинации, обладающий высокой чувствительностью, специфичностью и скоростью получения ответа (от 0 до 15 мин). Расшифровать этиологию менингитов, вызванных *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*, и определить тактику лечения в 30–40% случаев позволяет бактериологическое исследование СМЖ, в 60% — реакция латекс-агглютинации (РЛА), в 88% случаях — ПЦР [14–17]. Комплекс исследований (бактериологических и иммунологических) повышает диагностику БГМ с 46 до 88%, а при раннем поступлении и отсутствии лечения — в 100%. [17]. Показателем эффективности лечения БГМ при различных возбудителях может стать исследование уровня лактата в СМЖ. Показано, что при менингококковом менингите уровень лактата в СМЖ снижался с $14,2 \pm 0,67$ ммоль/л ($M \pm m$) при поступлении до $2,1 \pm 0,18$ ммоль/л ($M \pm m$), при пневмококковом — с $12,6 \pm 0,87$ до $6,0 \pm 1,2$ ммоль/л ($M \pm m$), при менингите неуточнённой этиологии — с $9,9 \pm 1,38$ до $2,8 \pm 0,29$ ммоль/л ($M \pm m$) [18]. Внедрение в практику ПЦР-диагностики, определение уровня лактата, pH и D-димера фибрина в СМЖ позволили повысить до 98% эффективность ранней диагностики БГМ, расшифровку этиологии БГМ с 75 до 91% и снизить летальность с 16% в 2006 г. до 5,9% в 2016 г. [16–18].

Менингиты отличаются друг от друга по этиологии, характеру клинического течения болезни и степени чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам. Основным критерием дифференциальной диагностики природы менингита является исследование СМЖ (таблица).

Важнейшие ликворологические дифференциально-диагностические признаки менингитов

Признаки	Гнойные (бактериальные), в т. ч. менингококковые	Туберкулёзный менингит	Серьёзные вирусные менингоэнцефалиты	Нормальный ликвор
Цвет, прозрачность	Белесоватый и зеленовато-мутный	Бесцветный, ксантохромный, опалесцирующий	Бесцветный, прозрачный, опалесцирующий	Бесцветный, прозрачный
Цитоз (количество клеток в 1 мм ³)	10000 и более	200–700	50–800	2–8
Цитограмма				
Лимфоциты, %	0–4	40–60	80–100	80–85
Нейтрофилы, %	60–100	20–40	0–20	3–5
Белок, %	0,66–16,0	1,0–3,3	0,33–1,0	0,16–0,33
Осадочные реакции (Панди, Нонне-Апельта)	++++	+++	++	—

Приводим **клинический пример** трудности диагностики менингита у больной с невыраженным менингеальным симптомокомплексом. Больная С., 74 лет, бригадой скорой медицинской помощи была доставлена в приёмное отделение НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД» с предварительным диагнозом: острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), пневмония. Со слов родственников внезапно ухудшилось самочувствие: появилась резкая боль в правом ухе, озноб, температура — 38,5°C, артериальное давление (АД) повысилось до 180/90 мм рт. ст., не отвечала на заданные вопросы, отказывалась от еды. Из анамнеза известно, что в течение длительного времени страдает гипертонической болезнью с повышением АД до 200/100 мм рт. ст. На фоне гипотензивной терапии АД адаптировано 120/80 мм рт. ст. В 2005 г. диагностирован сахарный диабет 2-го типа. Коррекция гликемии проводилась сахароснижающими препаратами. С 2012 по 2017 гг. принимала Галвус/Мет в дозе 50/1000 мг × 2 раза в день. Уровень гликемии сохранялся в пределах референтных значений. В 1985 г. — экстирпация матки с придатками (генез не ясен). В 2003 г. перенесла ОНМК в бассейне вертебро-базиллярной артерии. В 2004 г. — субтотальная струмэктомия узлового зоба, с этого периода принимает тироксин по 150 мг/сут. Протезирование коленных суставов в 2010 и 2014 гг., в 2016 г. перенесла внебольничную пневмонию.

Объективный статус при поступлении: состояние больной тяжёлое, заторможена, на вопросы отвечает односложно. Рост — 160 см, масса тела — 120 кг, температура — 38,5°C. Склеры и видимые слизистые — бледные. Кожа тёплая, сухая, мацерация в области паховых складок и молочных желез, периферических отёков нет. Группы периферических лимфоузлов не увеличены. Перкуторно: лёгочный звук с коробочным оттенком. Дыхание проводится по всем лёгочным полям, хрипы не выслушиваются, ЧД — 18 в 1 минуту. Границы сердца: левая граница отстает на 1,5 см кнаружи от средино-ключичной линии, пульс — 80 уд/мин, ритмичный, АД — 140/80 мм рт. ст. Тоны сердца ритмичные, шумов нет. При аускультации сонной артерии шумы не выслушиваются. Живот при пальпации мягкий, безболезненный, печень выступает из-под края реберной дуги на 1,5 см, селезёнка перкуторно не увеличена. Симптом покалывания по поясничной области с обеих сторон отрицательный.

Неврологический статус. Больная в сознании, заторможена, сонлива, быстро истощается, менингеальные признаки: ригидность затылочных мышц — 3 п. п., с-м Кернига отрицательный. ЧМН: зрачки равномерны, фотореакция (ФР) сохранена, нистагма нет, парез взора вправо, правосторонний гемипарез, мышечный тонус обычный, с-м Бабинского справа. Больная была гос-

питализирована в блок интенсивной терапии с подозрением на ОНМК, где в связи с нарастанием дыхательной недостаточности переведена на искусственную вентиляцию лёгких (ИВЛ). С целью нейровизуализации, произведена МРТ головного мозга.

На серии МРТ, взвешенных проекциях визуализированы суб-супратенториальные структуры, в белом веществе субкортикально, перивентрикулярно в проекции моста, а также в глубоких отделах — многочисленные сливные очаги повышенного сигнала по T2 и TIRM до 10 мм. У передних и задних боковых желудочков визуализируются зоны глиоза, в задних отделах правой височной области — участок глиоза размерами 11×10 мм. Боковые желудочки симметричны, третий и четвёртый желудочки мозга обычной формы и умеренно расширены. Гипофиз вертикальным размером 2,1 мм. Дополнительных образований в области тимосто-мозговых углов не отмечено. Выраженное снижение пневмотизации сосцевидных отростков.

МРТ в динамике — выявлены множественные очаги сосудистого генеза (постишемического), воспалительные изменения ячеек сосцевидных отростков и среднего уха справа со сниженной пневмотизацией, и признаки «пустого» турецкого седла. Итак, по данным МРТ признаков ОНМК не обнаружено, картина наиболее вероятно соответствует ангиоэнцефалопатии.

В рамках поиска источника возможной тромбоэмболии, больной было выполнено УЗИ сосудов нижних конечностей. Признаков нарушения проходимости глубоких и подкожных вен нижних конечностей не выявлено. Одновременно было выполнено УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства. Признаков патологических изменений не обнаружено.

Рентгенография органов грудной клетки: видимые лёгочные поля прозрачные, лёгочный рисунок усилен, деформирован, преимущественно в нижне-латеральных отделах лёгких. Корни лёгких мало структурны, незначительно расширены. Плевральные синусы свободны. Тень сердца расширена влево. Аорта уплотнена. Итак, результат клинико-инструментального исследования позволяет исключить входной диагноз пневмонию.

С учётом сохраняющихся неврологических симптомов, проведена МСКТ головы с ангиографией интра- и экстракраниальных сосудов. Средние структуры мозга не смещены, боковые желудочки не расширены, незначительно ассиметричны D>S, не деформированы, не смещены, третий и четвёртый желудочки не изменены. Субарахноидальное пространство сглажено, плохо визуализируется. Сосцевидный отросток правой височной кости с признаками наличия жидкости в ячейках, пневматизация снижена, в центральных

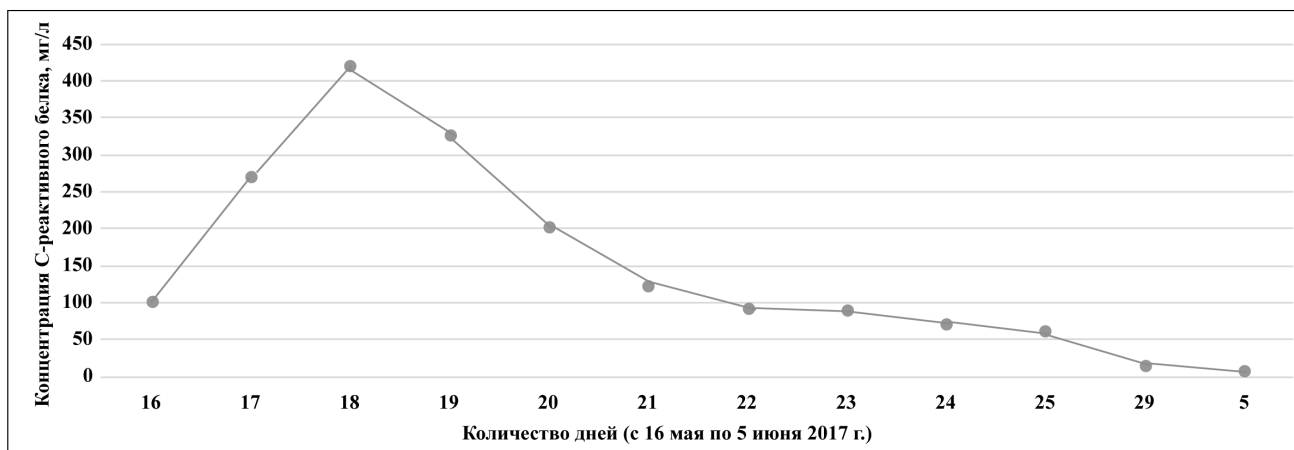


Рис. 1. Динамика концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови Л. М.

отделах перегородки между ячейками разрушены, образуют полость размером 16,6×7,6 мм с жидкостным содержимым. Каменисто-сосцевидный синус справа — расширен. Менее выраженные изменения выявляются в сосцевидном отростке левой височной кости. Верхнечелюстные пазухи воздушны. Носовая перегородка искривлена вправо до 3 мм. В сифонах с обеих сторон выявляются кальцинированные бляшки, интракраниальные сегменты внутренних сонных артерий без признаков значимого стенозирования просветов. Средние, передние и задние мозговые артерии равномерного калибра, типично делятся, без признаков стеноза, визуализируются вплоть до терминальных отрезков. Данных за аневризмы, либо артериовенозные мальформации не получено. Виллизиев круг разобщен за счёт отсутствия соединительных артерий. Позвоночные артерии диаметром 3,7 мм правая и 3,6 мм левая, имеют ровные контуры, без признаков стенотического поражения, либо значимой экстравазальной компрессии. Общие сонные артерии с обеих сторон типично отходят.

Заключение. По данным МСКТ, выявлены признаки двухстороннего мастоидита и правостороннего среднего отита. Отёк головного мозга.

При осмотре ЛОР врачом: состояние тяжёлое, сознание soporозное, жалобы на боль в правом ухе. В течение многих лет пользуется слуховым аппаратом. При пальпации в проекции околоносовых пазух, болезненности не отмечает. Слизистая оболочка носа бледно-розового цвета, выделения слизистые, не обильные. Стенка глотки не изменена, лимфатические узлы не увеличены, слуховые проходы свободны, контуры барабанной перегородки сохранены. За перепонками с двух сторон прослеживаются кровянистые выделения. При парацентезе барабанной перепонки (справа) получено сукровичное отделяемое, взят мазок из правого уха для микроскопического и бактериологического исследования для выявле-

ния возбудителя с определением чувствительности к антимикробным препаратам. Поставлена турунда с осмотолом. Предварительная концепция диагноза — гематотимпанум (неясного генеза). Эмпирическую терапию (ампициллин 12,0 г/сут. в комбинации с цефтриаксоном 4,0 г/сут. в/в, капельно) продолжить.

Обсуждение

Многообразие клинических форм менингита и различная этиологическая природа инфекционного процесса затрудняло постановку диагноза, в связи с чем проводился поиск причин тяжёлого состояния. Результаты инструментальных данных (рентгенография грудной клетки, УЗИ, МРТ, МСКТ головного мозга и сосудов) не подтверждали входящий диагноз (ОНМК и пневмония). Однако показатели лабораторного исследования (СРБ — 102–422,7 мг/л, прокальцитонин (ПКТ) — 1,22–13,1 нг/мл, D-димер — 8585–23000 мкг/л, лейкоцитоз — 14,37–20,81 $10^9/L$, СОЭ — 42–117 мм/л и др.) свидетельствовали о тяжести инфекционного процесса (рис. 1–3). Имеющиеся данные первичного осмотра больной (изменённый ментальный статус), появление минимальных признаков менингита и результаты лабораторных исследований позволили назначить эмпирическую антибактериальную терапию на основе ампициллина (12,0 г/сут) и цефтриаксона (4,0 г/сут) в/в, капельно. На этом фоне отмечалась положительная динамика: снижение температуры от 38,5°C до 37,0–37,2°C, регресс маркеров воспаления — С-реактивного белка с 422,7 мг/л до 9,7 мг/л (см. рис. 1) и прокальцитонина (ПКТ) с 13,1 нг/мл до 1,49 нг/мл (см. рис. 2). Однако оставался субфебрилитет, положительные осадочные пробы, лейкоцитоз, ускоренная СОЭ, нарастал уровень D-димера в крови до 23000 мкг/л, при норме — от 0 до 500 мкг/л (см. рис. 3), что потребовало изменить тактику лечения.

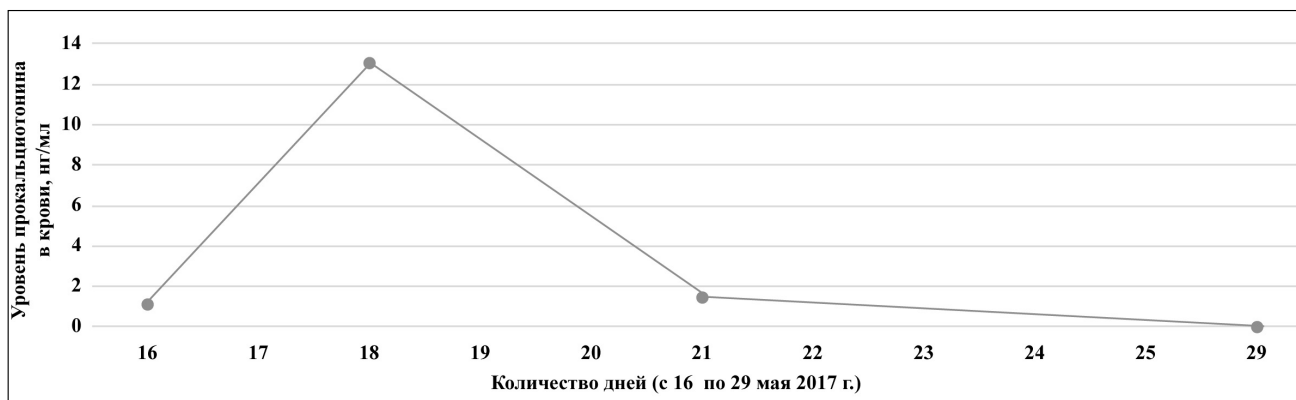


Рис. 2. Динамика уровня прокальцитонина в крови Л. М.

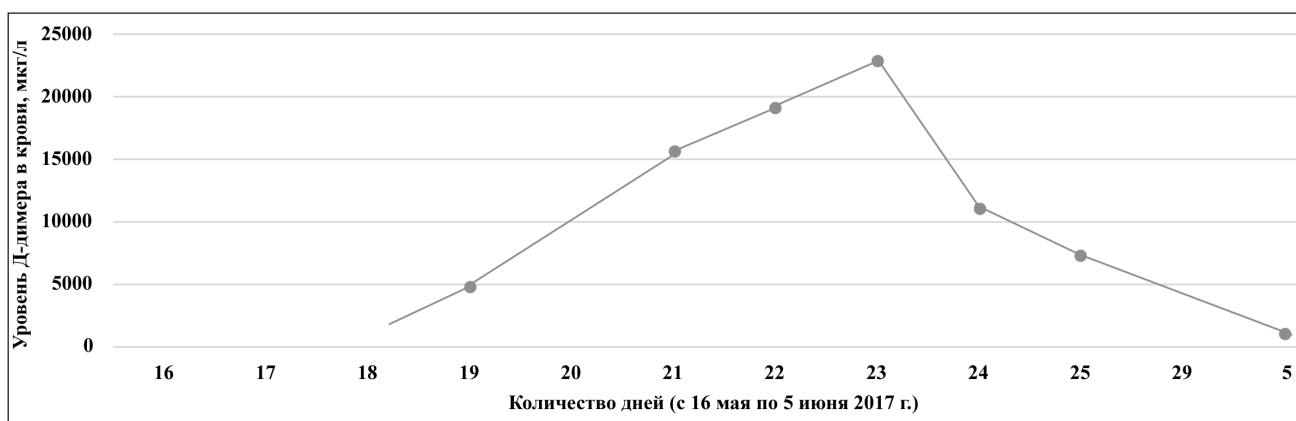


Рис. 3. Динамика количественного содержания в крови Л. М. Д-димера

В подборе этиотропной терапии важны результаты микробиологических исследований биоматериалов (СМЖ, кровь, соскобы и мазки из локусов воспаления). Люмбальная пункция выполнена после поступления в стационар. Получен мутный ликвор, 2 мл, под низким давлением. Взяты анализы: цитоз, биохимия, посев. Цвет СМЖ — ксантохромный, прозрачность неполная. Реакция Панди — положительная. Микроскопическое исследование СМЖ: цитоз — нейтрофилы густо покрывают всю камеру, количественный подсчёт невозможен, нейтрофилы составляют 99%, лимфоциты — 1%, белок — 6,6 г/л, глюкоза — 0,02 ммоль/л, калий — 3,4 ммоль/л, натрий — 137 ммоль/л, хлор — 118 ммоль/л. При окрашивании мазка СМЖ по Граму выявлены грамположительные кокки, морфологически сходные с *S.pneumoniae*. Мониторинг посевов отделяемого из правого уха был неинформативен. Однако исследование соскоба из правого уха молекулярно-генетическим методом ПЦР дал положительный результат на *S.pneumoniae* и отрицательный на *L.monocytogenes*.

Ключевую роль в назначении этиотропной терапии занимают микробиологические исследования СМЖ и крови. Бактериологическое исследование СМЖ проводили в соответствии с

методическими рекомендациями [19, 20]. На 3-и сутки от заболевания при посеве СМЖ выделен *S.pneumoniae*, 10^7 КОЕ/мл. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера—Хинтона с добавлением 5% дефибринированной крови барана [21]. Выделенный штамм *S.pneumoniae* был чувствителен к бета-лактамам: цефалоспорином (цефокситину, цефотаксиму, цефоперазону/сульбактаму), карбапенемам (имипенему, меропенему), амоксиклаву, к макролидам (азитромицину, кларитромицину) и умеренночувствителен к офлоксацину. На 6-е сутки при посеве крови на стерильность (3-кратно в течение первых суток госпитализации), отмечался рост *S.pneumoniae* с выраженной чувствительностью к тестируемым антибиотикам.

Принимая во внимание полученные клинико-лабораторные данные, чувствительность выделенного штамма *S.pneumoniae* к бета-лактамам антимикробным препаратам и высокую проницаемость через гематоэнцефалический барьер, был назначен меропенем. Инфузия меропенема — 6,0 г/сут., высокая биодоступность и сохраняющаяся активность антибиотика способствовали успеху терапии, т. е. «пуля» достигла желаемой цели. Извест-

но, что тяжесть инфекционного процесса определяется не только природой возбудителя, но и влиянием других механизмов, а именно иммунодефицитным состоянием (сахарный диабет, протезы коленных суставов и др.). На момент поступления больной в стационар, гликемия составляла 24,13 ммоль/л, гликированный гемоглобин — 7,5 ммоль/л, С-пептид — 2,9 нмоль/л, в связи с чем был назначен инсулин актрапид (перфузия 1–2 ед./ час и п/кожно в дозе 8 ед. каждые 3 ч). На этом фоне на четвертые сутки гликемия достигла уровня 8,1–9,01 ммоль/л, что позволило перейти на оральные сахароснижающие препараты (галвус/Мет 50/1000 мг *per os* 2 раза/сутки). Одновременно проводилась антикоагулянтная, антиоксидантная и гипотензивная терапия, что обеспечило положительный исход болезни.

Заключение

Любая клиническая задача по инфекционно-воспалительному процессу (менингит) никогда не имеет однозначного решения. Поэтому большой интерес представляют вопросы диагностики и лечения больных с данной патологией. Тем не менее, среди разнообразных диагностических и лечебных подходов, есть ключевые методы исследования, которые позволили выявить природу инфекционного процесса (бактериологическое исследование СМЖ, крови,

ПЦР и др.), поставить диагноз вторичного отогенного бактериального пневмококкового менингита и провести этиотропную антибактериальную терапию. Анализ данного клинического случая показал, что тяжесть инфекционно-воспалительного процесса (менингит) определялась не только возбудителем *S.pneumoniae*, но и имеющимся вторичным иммунодефицитным состоянием (сахарный диабет, протезы и др.). В связи с чем, существенное внимание уделялось не только коррекции гликемии, антимикробной, но и антиоксидантной терапии, что и обеспечило успех лечения.

Однако продолжающееся распространение антибиотикоустойчивых возбудителей делает необходимым разработку новых терапевтических схем и режимов, позволяющих контролировать проявление патогенных свойств бактерий. Следует обратить внимание на новые антибиотики: даптомицин, тедизолид, талованцин, цефтаролин, проявляющие высокую активность в отношении метициллинорезистентных стафилококков (MRSA, MRSE, PRP) и ванкомициноустойчивых энтерококков. Большой интерес представляет цефтаролин, обладающий широким спектром антимикробной активности, что позволяет использовать его для эмпирической терапии (исключая природу инфекционного процесса, обусловленного *P.aeruginosa*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по инфекционным болезням. Под редакцией Лобзина Ю.В., СПб.: 2000. — 226 с. / *Rukovodstvo po infektsionnym boleznyam. Pod redaktsiej Lobzina Ju.V.*, SPb, 2000; 226. [in Russian]
2. Tunkel A.R. Bacterial meningitis. Philadelphia, 2001, 288 с. / *Bacterial Meningitis By Allan R. Tunkel Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 288.*
3. Королева И.С., Белошицкий Г.В., Королева М.А., Закроева И.М., Спирихина Л.В., Миронов К.О., Шипулин Г.А. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации: десятилетнее эпидемиологическое наблюдение. Эпидемиология и инфекционные болезни, актуальные вопросы. — 2013. — № 2. — С. 15–21. / *Koroleva I.S., Beloshitskij G.V., Koroleva M.A., Zakroeva I.M., Spirikhina L.V., Mironov K.O., Shipulin G.A. Meningokokkovaya infektsiya i gnojnye bakterial'nye meningity v Rossijskoj federatsii: desyatiletnee epidemiologicheskoe nabljudenie. Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni, Aktual'nye Voprosy 2013; 2: 15–21 [in Russian].*
4. Шишов А.С., Григорьевская У.Б., Гурьянов А.В., Данилова Л.В., Саврасова Н.М., Соловьева Л.Я., Заикин В.Л., Куприянова Л.В., Петряев В.Г., Рудометов Ю.П., Русанова С.А., Шуба Г.А., Арсеньева Т.В., Келли Е.И. Роль бактериологического исследования при диагностике и лечении бактериальных инфекций с синдромом гнойного менингита. Неврология и психиатрия. — 2011. — № 5. — С. 75–80. / *Shishov A.S., Grigor'evskaya U.B., Gur'yanov A.V., Danilova L.V., Savrasova N.M., Solov'eva L.Ya., Zaikin V.L., Kupriyanova L.V., Petryaev V.G., Rudometov Ju.P., Rusanova S.A., Shuba G.A., Arsen'eva T.V., Kelli E.I. Rol' bakteriologicheskogo issledovaniya pri diagnostike i lechenii bakterial'nykh infektsij s sindromom gnojnogo meningita. Nevrologiya i Psikiatriya 2011; 5: 75–80 [in Russian].*
5. Lu C., Chang W., Chang H. Klebsiella meningitis in adults: clinical features, prognostic factors and therapeutic outcomes. J Clin Neurosci 2002; 9 (5): 533–538.
6. Александрова И.В., Белобородов В.Б., Лобзин Ю.В., Карпов И.А., Матвеев В.А., Пилипенко В.В., Самсон А.А., Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Практические подходы к лечению бактериальных менингитов. Антибиотики и химиотерапия. — 2007. — Т. 52. — № 3. — С. 3–21. / *Aleksandrova I.V., Beloborodov V.B., Lobzin Ju.V., Karpov I.A., Matveev V.A., Pilipenko V.V., Samson A.A., Sidorenko S.V., Yakovlev S.V. Prakticheskie podkhody k lecheniyu bakterial'nykh meningitov. Antibiotiki i khimioter 2007; 52 (3): 3–21 [in Russian].*
7. Курдюмова Н.В., Данилов Г.В., Еришова О.Н., Савин И.А., Соколова Е.Ю., Александрова И.А., Шифрин М.А. Особенности развития внут-
- рибольничных менингитов у пациентов отделения нейрореанимации. М.: Вопросы нейрохирургии. — 2015. — № 3. — С. 55–59. / *Kurdjumova N.V., Danilov G.V., Ershova O.N., Savin I.A., Sokolova E.Jyu., Aleksandrova I.A., Shifrin M.A. Osobennosti razvitiya vnutribol'nichnykh meningitov u patsientov otdeleniya nejroreanimatsii. M.: Voprosy nejrokhirurgii 2015; 3: 55–59 [in Russian].*
8. Курдюмова Н.И., Еришова О.Н., Савин И.А., Шифрин М.А., Данилов Г.В., Александрова И.А., Гаджиева Н. О.А., Моченова Н.Н., Соколова Е.Ю. Дренаж-ассоциированные менингиты у пациентов отделения нейрореанимации. Результаты пятилетнего проспективного наблюдения. Вопросы нейрохирургии. — 2017. — № 6. — С. 56–62. / *Kurdjumova N.V., Danilov G.V., Ershova O.N., Savin I.A., Sokolova E.Jyu., Aleksandrova I.A., Shifrin M.A. Osobennosti razvitiya vnutribol'nichnykh meningitov u patsientov otdeleniya nejroreanimatsii. M.: Voprosy nejrokhirurgii 2017; 6: 56–62 [in Russian].*
9. Medeiros E., Basso M., Sielfeld M. et al. Nosocomial Acinetobacter baumannii meningitis in neurosurgical patients: epidemiology and clinical features. In: Abstract book of 37 ICAAC — Toronto, 1997; 307.
10. Белошицкий Г.В., Королева И.С. Актуальные проблемы профилактики пневмококковых менингитов в Российской Федерации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2010. — № 2. — С. 56–60. / *Beloshitskij G.V., Koroleva I.S. Aktual'nye problemy profilaktiki pnevmokokkovykh meningitov v Rossijskoj Federatsii. Epidemiologiya i vaktisinoprofilaktika 2010; 2: 56–60 [in Russian].*
11. Спирихина Л.В., Королева И.С., Закроева И.М. Бактериальные менингиты неменингококковой этиологии в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни, актуальные вопросы. — 2013. — № 2. — С. 27–32. / *Spirikhina L.V., Koroleva I.S., Zakroeva I.M. Bakterial'nye meningity nemeningokokkovoj etiologii v Rossijskoj federatsii. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni, aktual'nye voprosy 2013; 2: 27–32 [in Russian].*
12. Harrison L.H. et al. Vaccines. 2009; V27S, B51–B63.
13. Венгеров Ю.Я., Ченцов В.Б., Нагибина М.В., Смирнова Т.Ю., Молотилова Т.Н., Крючкова Г.В., Чернышов Д.В., Михалинова Е.А., Мясников В.А. Современные принципы диагностики и лечения больных бактериальными гнойными менингитами. Consilium Medicum. Хирургия. (Прил.). — 2009. — № 01. — С. 26–38. / *Vengerov Ju.Ya., Chentsov V.B., Nagibina M.V., Smirnova T.Jyu., Molotilova T.N., Kryuchkova G.V., Chernyshov D.V., Mikhalinova E.A., Myasnikov V.A. Sovremennye printsipy diagnostiki i lecheniya bol'nykh bakterial'nymi gnojnymi meningitami. Consilium Medicum. Khirurgiya 2009; 01: 26–38 [in Russian].*

14. Венгеров Ю.Я., Нагибина М. В., Михалинова Е. П., Раздобарина С. Е., Молотилова Т. Н., Пархоменко Ю. Г., Мозгалева Н. В., Смирнова Т. Ю., Свистунова Т. С. Пневмококковый менингит. Проблема высокой летальности. Лечащий врач. — 2013. № 5. — С. 14–16. / *Vengerov Jyu.Ya., Nagibina M. V., Mikhalinova E. P., Razdobarina S. E., Molotilova T. N., Parkhomenko Jyu. G., Mozgaleva N. V., Smirnova T. Jyu., Svistunova T. S. Pnevmonokokkovyj meningit. Problema vysokoj letal'nosti. Lechashchij vrach* 2013; 5: 14–16 [in Russian].
15. Белобородов В.Б. Антибактериальная терапия менингитов. Учебное пособие для участковых врачей-терапевтов. М.: 2008. — 48 с. / *Beloborodov V.B. Antibakterial'naya terapiya meningitov. Uchebnoe posobie dlya uchastkovykh vrachej-terapevtov. M.: 2008; 48* [in Russian].
16. Нагибина М.В. Бактериальные гнойные менингиты: актуальные проблемы патогенеза, диагностики и лечения: диссертация...доктора медицинских наук. 2017. — 278 с. / *Nagibina M.V. Bakterial'nye gnojnye meningity: aktual'nye problemy patogeneza, diagnostiki i lecheniya: dissertatsiya...doktora Meditsinskikh nauk. 2017. 278*. [in Russian].
17. Венгеров Ю.А., Нагибина М.В., Коваленко Т.М., Матросова С.В., Русин П.В., Смирнова Т.Ю., Михалинова Е.П., Раздобарина С.Е. Актуальные аспекты патогенеза, диагностики и лечения бактериальных гнойных менингитов. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2018. — № 7 (1). — С. 78–85. / *Vengerov Jyu.A., Nagibina M.V., Kovalenko T.M., Matrosova S.V., Rusin P.V., Smirnova T. Jyu., Mikhalinova E.P., Razdobarina S.E. Aktual'nye aspekty patogeneza, diagnostiki i lecheniya bakterial'nykh gnojnykh meningitov. Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* 2018; 7 (1): 78–85 [in Russian].
18. Нагибина М. В., Венгеров Ю. Я., Чернышев Д. В., Коваленко Т. М., Молотилова Т. Н., Михалинова Е. П., Раздобарина С. Е., Свистунова Т. С., Беликова Е. В., Байкова Л. Б., Смирнова Т. Ю., Сафонова А. П. Комплексное исследование спинномозговой жидкости при бактериальных гнойных менингитах. Лечащий врач. — 2015. — № 11. — С. 29–33. / *Nagibina M. V., Vengerov Jyu. Ya., Chernyshev D. V., Kovalenko T. M., Molotilova T. N., Mikhalinova E. P., Razdobarina S. E., Svistunova T. S., Belikova E. V., Bajkova L. B., Smirnova T. Jyu., Safonova A. P. Kompleksnoe issledovanie spinnomozgovoj zhidkosti pri bakterial'nykh gnojnykh meningitakh. Lechashchij vrach* 2015; 11: 29–33 [in Russian].
19. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов: Методические указания 4.2.1887-04. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005. / *Laboratornaya diagnostika meningokokkovoj infektsii i gnojnykh bakterial'nykh meningitov: Metodicheskie ukazaniya 4.2.1887-04. — M.: Federal'nyj tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2005.* / *Laboratory diagnostics of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis: guidelines 4.2.1887-04. Moscow: Federal center for hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor 2005.* [in Russian].
20. Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов: Методические рекомендации МР 4.2.0078/1-13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2014; 11 с. / *Ispol'zovanie pitatel'nykh sred dlya diagnostiki gnojnykh bakterial'nykh meningitov: Metodicheskie rekomendatsii MR 4.2.0078/1-13. M.: Federal'nyj tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora. 2014; 11 s.* / *The use of nutrient media for the diagnosis of purulent bacterial meningitis: guidelines MR 4.2.0078/1-13. Moscow: Federal center for hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor 2014; 11.* [in Russian].
21. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04. Москва, 2004. / *Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.1890-04. Moskva, 2004; 2004.* [in Russian].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Соколова Валентина Ивановна — к. м. н., доцент кафедры клинической фармакологии и терапии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

Сычёв Дмитрий Алексеевич — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, ректор и заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская меди-

цинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

Васильева Елена Ивановна — к. б. н., заведующая бактериологической лабораторией Негосударственное частное учреждение здравоохранения «Научный клинический центр Открытого Акционерного Общества «Российские железные дороги» (НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД»), Москва

Серёдкин Евгений Альбертович — заведующий неврологическим отделением Негосударственное частное учреждение здравоохранения «Научный клинический центр Открытого Акционерного Общества «Российские железные дороги» (НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД»), Москва

Стратификация факторов, влияющих на эффективность антибактериальной терапии раневых дефектов при синдроме диабетической стопы

*Т. Н. КУЗЬМИНА¹, Н. В. РОГОВА^{1,2}

¹ ФГБУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград

² ГБУ Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград

Stratification of Factors Determining the Effectiveness of Antibacterial Therapy of Wound Defects in Diabetic Foot Syndrome

*T. N. KUZMINA¹, N. V. ROGOVA^{1,2}

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd

² Volgograd Medical Scientific Centre, Volgograd

У пациентов с раневыми дефектами на фоне синдрома диабетической стопы выделены и проанализированы факторы, определяющие эффективность антибактериальной терапии; изучен характер микрофлоры и её чувствительность к антибиотикам. Установлено, что пациенты с СДС в Волгограде характеризуются как тяжёлые, с затяжными хроническими инфекционными процессами. С учётом полученных результатов даны рекомендации для улучшения оказания медицинской помощи пациентам с СДС.

Ключевые слова: сахарный диабет, синдром диабетической стопы, раневые дефекты, антибиотикотерапия, антибиотикорезистентность, клинические рекомендации, стандарты медицинской помощи, ведение медицинской документации, фармакоэпидемиология.

The article identifies and analyzes the factors determining the effectiveness of antibacterial therapy of wound defects in patients with diabetic foot syndrome. Sensitivity to antibiotics and the nature of microflora of the strains received from patients with diabetic foot syndrome were studied. It was established that patients with diabetic foot syndrome in Volgograd suffered chronic infectious processes. The authors give recommendations for improving the provision of medical care to patients with diabetic foot syndrome based on the results obtained.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic foot syndrome, wound defects, antibacterial therapy, antibiotic resistance, clinical guidelines, medical care standards, medical documentation management, pharmacoepidemiology.

Введение

Особое место среди поздних осложнений сахарного диабета 2 типа (СД 2) занимает синдром диабетической стопы (СДС). У пациентов с СДС на фоне нейроэндокринных, сосудистых расстройств и изменений в системе гомеостаза происходит ассоциирование бактериальной инфекции, ведущей к развитию раневых дефектов и язвенно-некротических процессов. Раневые дефекты на фоне СДС являются одной из основных причин его прогрессирования, госпитализации и характеризуются повышенным риском смертности больных СД 2. При отсутствии своевременного адекватного диагностического поиска и лечения, раневые дефекты трансформируются в язвенные дефекты с последующим присоединением бактериальной инфекции и развитием гангрены нижней конечности. Только строгое соблюдение клинических рекомендаций (КР) и стандартов оказания помощи может обеспечить эффективное лечение раневых дефектов на фоне СДС.

© Т. Н. Кузьмина, Н. В. Рогова, 2019

*Адрес для корреспонденции: email: tata_razdrogina@mail.ru

Важнейшим элементом, определяющим успех рационального лечения больных с раневыми дефектами на фоне СДС, является рациональная антибактериальная терапия (АТ), способствующая скорейшему купированию проявлений инфекции и эрадикации возбудителя. Проведение фармакоэпидемиологических исследований в данной области позволяет оптимизировать комплексную фармакотерапию пациентов с инфекциями кожи и мягких тканей на фоне СДС [1].

Таким образом, цель нашего исследования — изучить факторы, влияющие на эффективность антибактериальной терапии при раневых дефектах у пациентов с СДС, включая изучение структуры и показателей резистентности возбудителей, оценку степени соблюдения стандартов медицинской помощи.

Материал и методы

Дизайн исследования — ретроспективное описательное одномоментное фармакоэпидемиологическое исследование. На 1-м этапе в 2015 г. изучали медицинскую документацию одного крупного ЛПУ Волгограда [2]. На 2-м этапе мы расширили объём выборки, включив в неё медицинскую документацию всех крупных эндокринных центров Волгограда. Выборка в итоге составила 510 стационарных карт пациентов с синдромом диабетической стопы. Анализ результатов 1-го и 2-го этапов нашего исследования представим в данной публикации.

Результаты и обсуждение

Средний возраст пациентов составил $66,3 \pm 10,7$ лет (min — 33, max — 96). Исследуемая группа в 50,4% была представлена женщинами, в 49,6% — мужчинами. Полученные данные согласуются с данными федерального регистра больных сахарным диабетом [3].

Анализ результатов исследования позволил выделить факторы, определяющие эффективность антибактериальной терапии при раневых дефектах у пациентов с СДС, которые по степени важности можно стратифицировать следующим образом:

1. Своевременная адекватная диагностика инфекционного поражения.
2. Сроки забора, технология и транспортировка биологического материала в бактериологическую лабораторию.
3. Особенности структуры и показателей резистентности возбудителей.
4. Выбор антибактериального лекарственного средства (АБЛС), режима дозирования, длительности антибактериальной терапии в соответствии с КР и стандартами медицинской помощи.
5. Преемственность ведения пациентов и медицинской документации в ЛПУ.

Первую позицию списка факторов занимает диагностика. От того, как она будет проведена, зависит успех всего лечения пациента. Согласно стандартам медицинской помощи, диагностика раневого инфекционного поражения у пациентов с СДС включает в себя: преаналитический этап, аналитический этап и оценку антибиотикочувствительности выделенных патогенов. Основным методом диагностики инфекционного процесса в ране является бактериологическое исследование раневого отделяемого (уровень доказательности 1А) [4]. При раневых дефектах оно должно быть выполнено всем пациентам с наличием гнойного отделяемого [5]. В результате нашего исследования было выявлено, что бактериологический посев раневого отделяемого был проведен только 20,98% больным, что не соответствует требованиям КР и стандартов медицинской помощи, а главное, снижает вероятность принятия врачом верного решения при выборе АТ.

При анализе преаналитического этапа диагностического поиска мы оценивали сроки забора биологического материала для бактериологического исследования, так как это определяет качество и достоверность результатов, получаемых на последующих этапах микробиологического исследования [6]. По нашим данным, в среднем бактериологический посев раневого отделяемого был взят на $4,63 \pm 4,75$ день пребывания в стационаре, что не соответствует КР и стандартам оказания помощи больным с СДС. Вид и характер транспортировки биологического материала, а также выбор транспортной среды не указывались ни в стационарных

картах пациентов, ни в антибиотикограммах полученных из бактериологической лаборатории, что не позволило нам проанализировать данный важный аспект. В среднем длительность ожидания результатов бактериологического исследования составила $5,41 \pm 1,85$ дней. Полученные данные согласуются со средними сроками, изложенными в приказе №535 [7] «Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях ЛПУ».

Эмпирическая АТ была назначена 83,72% пациентам. При этом нами было выявлено, что 8% пациентам с СДС с наличием инфекционного процесса эмпирическая АТ была назначена не на 1-й день госпитализации, без обоснования в медицинской документации об отсроченном назначении АБЛС. После получения результатов бактериологического посева замена одного антибактериального препарата на препарат/препараты другой группы была проведена в 37% случаев. Замена антибактериального препарата допустима в процессе лечения, однако мы считаем полученный процент достаточно высоким, полученные данные свидетельствуют о некорректной стартовой АТ.

Следующим шагом нашего исследования стало изучение особенностей структуры и резистентности возбудителей раневых дефектов у пациентов с СДС. Рост микроорганизмов был выявлен при исследовании раневого отделяемого у 91,58% пациентов. Полученные цифры согласуются с данными литературы, согласно которым раневые дефекты при СДС характеризуются высоким риском присоединения бактериальной инфекции ввиду наличия благоприятных условий для прогрессирования и торпидного течения инфекционного процесса [8].

Технология проведения первичного посева биологических образцов на аналитическом этапе и методы оценки антибиотикочувствительности выделенных патогенов не были указаны в медицинской документации, что серьезно затрудняет в дальнейшем преемственность в лечении пациента.

Анализ спектра выявленных возбудителей представлен на рис. 1.

Среди грамотрицательных бактерий были выделены грамотрицательные палочки и грамотрицательные кокки — 68,6 и 31,4%, соответственно; среди грамположительных бактерий были выделены грамположительные кокки и грамположительные палочки — 96,1 и 3,9%, соответственно. Полученная микрофлора не совсем типична для пациентов с раневыми дефектами на фоне СДС. По данным литературы, основными микроорганизмами в раневом отделяемом у данного контингента пациентов являются грамположительные бактерии, по данным нашего исследования в 46% случаев были выявлены грамотрицательные бактерии. Полученные результаты свидетельствуют об ос-



Рис. 1. Полученная микрофлора из раневого отделяемого у пациентов с СДС.

ложнённом течении СДС и позволяют не только охарактеризовать популяцию в нашем регионе как более тяжёлую, но и указывают на проблему своевременной ранней диагностики инфекционного процесса у пациентов с СДС, а также возможно предшествующего нерационального использования АБЛС у данных пациентов.

Детализация спектра выявленных возбудителей у пациентов с раневыми дефектами на фоне СДС представлена на рис. 2.

В целом, в структуре выделенных возбудителей СДС лидирующую позицию занимает *S.aureus* (32,5%) (см. рис. 2). Полученные результаты сходны с данными литературы [9], согласно которым *S.aureus* является основным микроорганизмом, колонизирующим и инфицирующим повреждения кожного покрова у пациентов с СДС. Такое частое выделение данного возбудителя в раневом отделяемом свидетельствует о снижении защитных свойств кожи вокруг язвенного дефекта. Частыми микроорганизмами у пациентов с раневыми дефектами на фоне СДС, по данным проведённого исследования, были также *Enterococcus* (15,5%), *S.epidermidis* (12%), *E.coli* (7%), *Klibsiella spp.* (5%), *Enterobacter* (5%), грибы *Candida* (4%), *Acinetobacter* (4%), *P.aeruginosa* (4%) и др. Выделение энтеробактерий, помимо грамположительных кокков, у пациентов с СДС свидетельствует о наличии длительно незаживающих язв кожного покрова. По результатам прове-

дённого исследования, в 25,58% случаев у 32,65% больных с СДС установленной этиологии встречались ассоциации различных бактерий (таблица), что зачастую свидетельствует о тяжёлом хроническом гнойно-некротическом поражении. Среди микробных ассоциаций наиболее часто встречались ассоциации *Enterococcus* с различными возбудителями — 51,5%.

По записям в медицинской документации не представляется возможным установить, чем руководствовались врачи при выборе АБЛС и режимов их дозирования, так как за врачами не закреплена практика указывать в медицинской документации на основании каких КР и стандартов медицинской помощи был выбран алгоритм лечения. В то же время, федеральный закон №323 (пункт 1 части 3 статьи 80 ФЗ № 323) [10] обязывает врачей соблюдать стандарты медицинской помощи, на основании которых врач принимает ответственные для здоровья пациента решения.

При анализе медицинской документации было выявлено, что среднее количество дней антибиотикотерапии составило $8,68 \pm 4,03$ дней. Согласно Российским национальным рекомендациям по диагностике и лечению хирургических инфекций кожи и мягких тканей [9], средняя продолжительность АТ при инфекционном процессе на фоне СДС должна составлять не менее 7–14 дней и увеличивается в зависимости от тяжести инфекционного процесса. Однако в КР и стандартах медицинской помощи нет конкретных рекомендаций по срокам АТ у пациентов с СДС, а, следовательно, полученные данные не представляется возможным сравнить с КР. Учитывая, что инфекционный процесс у пациентов с СДС как правило приобретает тяжёлый затяжной характер, столь короткий срок назначения АБЛС можно оценить как нерациональный. Стоит

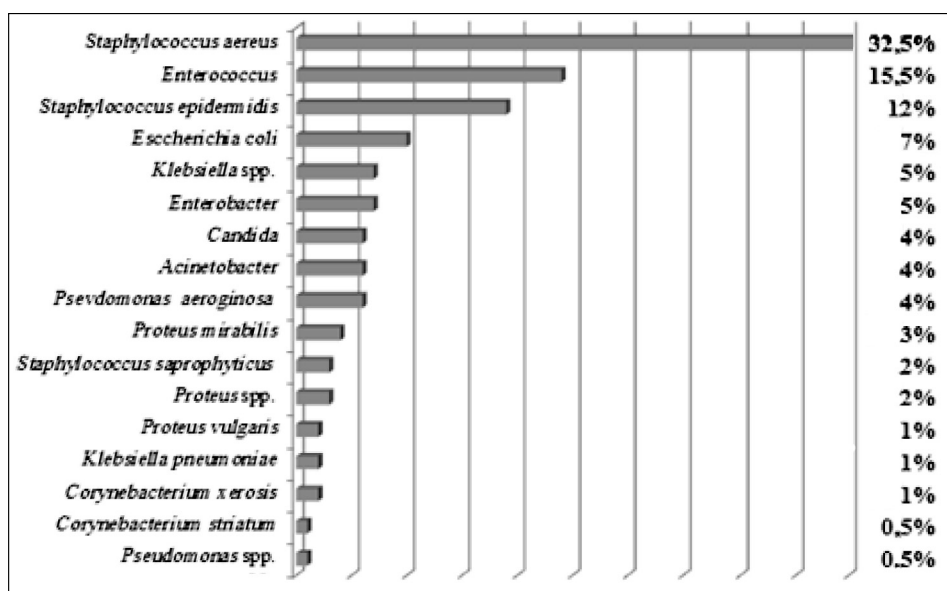


Рис. 2. Спектр возбудителей, высеянных из раневого отделяемого у пациентов с СДС.

Микробные ассоциации, выявленные при СДС у пациентов с СД 2

Возбудители	n	%
<i>Enterobacter</i> spp. + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>Acinetobacter</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>Proteus mirabilis</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + грибы <i>Candida</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>S.epidermidis</i> + <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	3
<i>Escherichia coli</i> + грибы <i>Candida</i>	1	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Corynebacterium xerosis</i>	1	3
<i>Klebsiella</i> spp. + <i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Enterococcus</i>	1	3
<i>Proteus</i> spp. + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	3
<i>Proteus vulgaris</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Enterococcus</i> + грибы <i>Candida</i>	1	3
<i>Staphylococcus aureus</i> + грибы <i>Candida</i>	1	3
<i>Acinetobacter</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + грибы <i>Candida</i>	1	3
<i>Enterococcus</i> + <i>Klebsiella</i> spp.	2	6,1
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Proteus mirabilis</i>	2	6,1
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Escherichia coli</i>	2	6,1
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Acinetobacter</i>	2	6,1
<i>Escherichia coli</i> + <i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	9,1
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Enterococcus</i>	5	15,5
Всего	33	

также отметить, что в медицинской документации не указывались причины прекращения АТ, что затрудняет анализ эффективности выбранных АБЛС.

Среди пациентов с раневыми дефектами на фоне СДС, у кого был выявлен рост возбудителя в раневом отделяемом при бактериологическом посеве, — 90,81% пациентов получали антибиотики, соответственно 9,9% пациентам с выявленным возбудителем не была назначена антибиотикотерапия. Причины, по которым антибиотики не были назначены при выделенных возбудителях, не были указаны в медицинской документации.

Среди пациентов с раневыми дефектами на фоне СДС, у кого не проводился бактериологический анализ раневого отделяемого, — 81,63% пациентов получали антибиотики. А это значит, что бактериологический посев для врача не являлся главным ориентиром при выборе АБЛС, и в данной ситуации врачебные назначения основывались только на наличии системной воспалительной реакции (температура, лейкоцитоз) и локальных признаках прогрессирующего гнойно-некротического процесса, либо АБЛС назначались пациентам с СДС после проведения опера-

тивного вмешательства на нижних конечностях без результатов бактериологического анализа.

Проанализируем структуру фармакотерапии возбудителей, которые наиболее часто встречались у пациентов с раневыми дефектами нижних конечностей на фоне СДС в ЛПУ Волгограда, это: *S.aureus*, *Enterococcus*, *S.epidermidis*.

При выявлении *S.aureus* в структуре назначений (рис. 3) преобладали цефтриаксон (33%), метронидазол (21%), ципрофлоксацин (10%).

По результатам бактериологического посева, *S.aureus* был чувствителен к цефтриаксону в 59% случаев, слабочувствителен — в 14% случаев и резистентен — в 27% случаев.

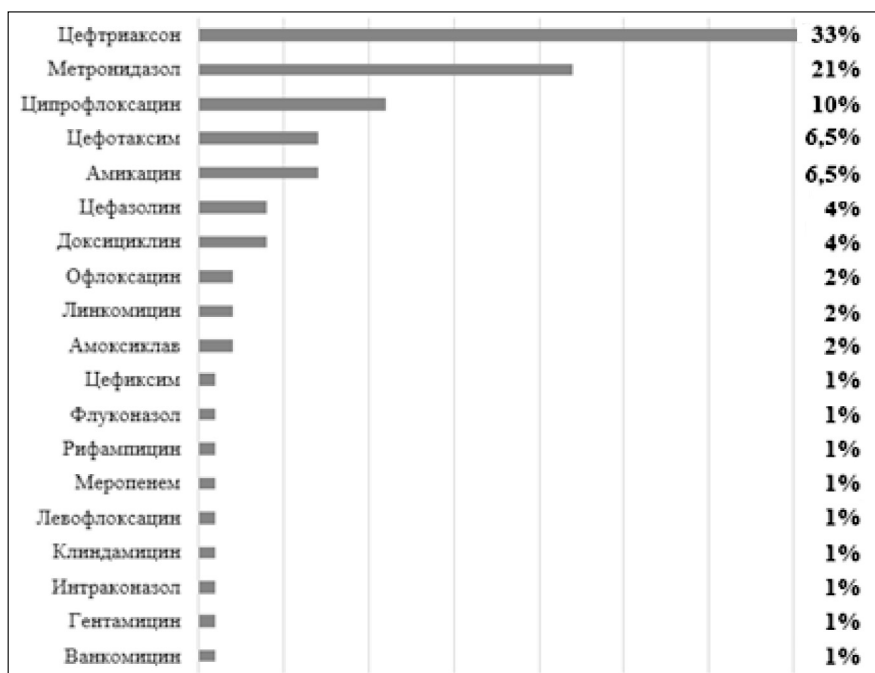


Рис. 3. Структура назначений АБЛС у пациентов с СДС при выявлении по результатам бактериологического посева *S.aureus*.

Резистентность к метронидазолу не определялась. К ципрофлоксацину данный возбудитель был чувствителен в 75,5% случаев, слабочувствителен — в 9% случаев и резистентен — в 15,5% случаев.

Согласно Российским национальным рекомендациям по диагностике и лечению хирургических инфекций кожи и мягких тканей, у пациентов с СДС цефтриаксон и ципрофлоксацин не включены в список препаратов 1-го ряда и альтернативных препаратов для лечения инфекционного поражения установленной этиологии. Стоит отметить, ципрофлоксацин включён только в альтернативные препараты для лечения инфекционного поражения эмпирическим способом.

При выявлении *Enterococcus* в структуре назначений (рис. 4) преобладали цефтриаксон (34%), метронидазол (17%), ципрофлоксацин (14,5%).

По результатам бактериологического посева, *Enterococcus* был чувствителен к цефтриаксону в 33% случаев, резистентен в 67% случаев. Резистентность к метронидазолу не определялась. К ципрофлоксацину данный возбудитель был чувствителен в 55% случаев, слабочувствителен — в 15% случаев и резистентен — в 30% случаев.

Согласно Российским национальным рекомендациям по диагностике и лечению хирургических инфекций кожи и мягких тканей, у пациентов с СДС цефтриаксон и ципрофлоксацин относятся к препаратам 1-го ряда для лечения инфекционного поражения установленной этиологии, однако по результатам бактериологического посева к данным препаратам была выявлена высокая резистентность — 67 и 30%, что свидетельствует о нерациональной антибиотикотерапии.

При выявлении *S.epidermidis* в структуре назначений (рис. 5) преобладали цефтриаксон (34%), метронидазол (24%), ципрофлоксацин (12%).

По результатам бактериологического посева, *S.epidermidis* был чувствителен к цефтриаксо-

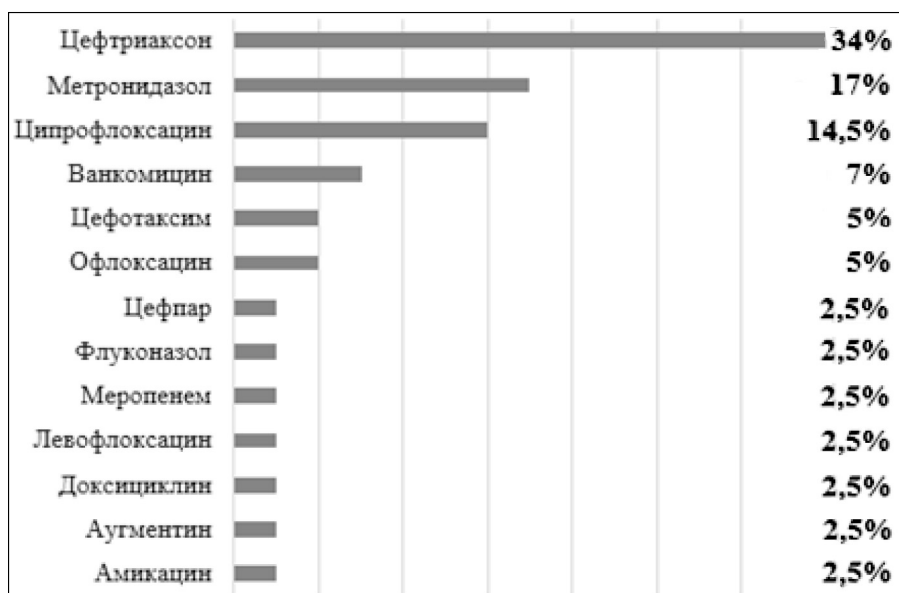


Рис. 4. Структура назначений АБЛС у пациентов с СДС при выявлении по результатам бактериологического посева *Enterococcus*.

ну в 100% случаев. Резистентность к метронидазолу не определялась. К ципрофлоксацину данный возбудитель был чувствителен в 59% случаев и резистентен в 42% случаев.

Стоит отметить, что *S.epidermidis* является условно-патогенным микроорганизмом с низким патогенным потенциалом и вызывающий инфекционный процесс зачастую у пожилых пациентов и лиц с иммунной дисфункцией. Данный микроорганизм не относится к типичным возбудителям раневых дефектов у пациентов с СДС и не представлен в КР по ведению данных пациентов. Данный возбудитель оказывает своё токсическое воздействие исключительно в поверхностном слое кожи. Стоит отметить высокую чувствительность данного возбудителя к цефтриаксону (100%), который был назначен в большинстве случаев (34%).

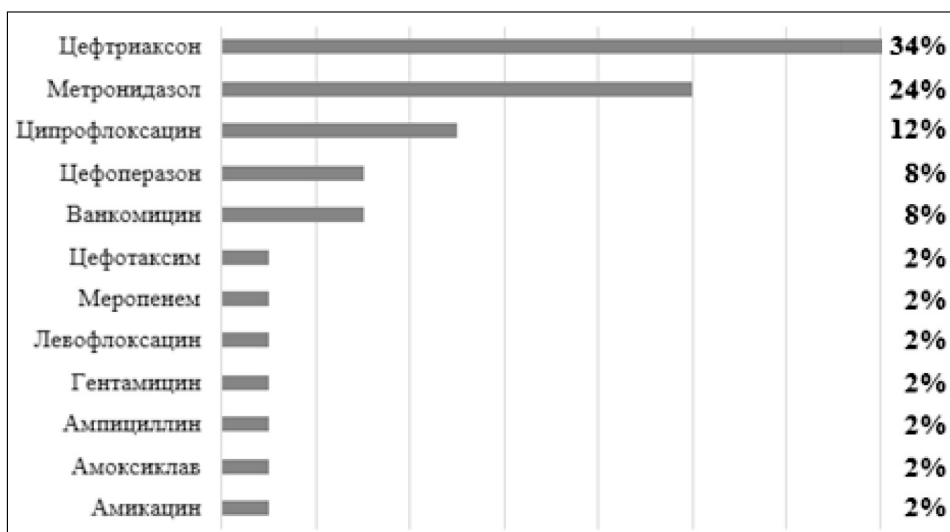


Рис. 5. Структура назначений АБЛС у пациентов с СДС при выявлении по результатам бактериологического посева *S.epidermidis*.

При анализе результатов проведённого исследования практически на каждом из этапов мы столкнулись с недостаточно чётким и полным ведением врачами ЛПУ медицинской документации, что в рамках эпидемиологического исследования не позволило выявить все возможные факторы, влияющие на эффективность АТ. Одно не вызывает сомнения, что такое ведение медицинской документации серьёзно нарушает преемственность ведения больных и на наш взгляд выступает отдельным фактором снижения эффективности проводимой терапии.

Заключение

Несмотря на большой накопленный опыт в лечении больных с раневыми дефектами на фоне СДС, в настоящее время врачами стационарного звена не в полном объёме соблюдаются КР и стандарты медицинской помощи. Существует объективная потребность в разработке и внедрению отдельных КР по диагностике и лечению ин-

фекционного процесса нижних конечностей у пациентов с СДС. Несоблюдение врачами КР стандартов медицинской помощи приводит к ошибкам в диагностическом алгоритме и выборе фармакотерапии.

Полученные эпидемиологические данные по возбудителям, выявленным в раневых дефектах, позволяют охарактеризовать больных с инфекционными поражениями нижних конечностей на фоне СДС — жителей г. Волгограда, как пациентов с тяжёлым течением заболевания, что требует серьёзного внимания к их ведению со стороны регионального комитета здравоохранения. Выявленные несоблюдения врачами КР по антибиотикотерапии ведёт к увеличению сроков стационарного лечения.

Выявленные недостатки ведения медицинской документации у пациентов с СДС обуславливают потребность усовершенствования нормативной и методической базы для врачей по данному вопросу, а также включение этих аспектов в программы курсов повышения квалификации специалистов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров В.И., Рогова Н.В., Ледяев Я.М., Сердюкова Д.М. Изучение влияния длительной терапии производными сульфонилмочевины на ёмкость ферментной системы биотрансформации лекарственных средств в печени (изофермент CYP2C9) у больных сахарным диабетом типа 2 в Волгограде. Вестник ВолгГМУ. — 2010. — № 2 (34). — С. 14–18. / Petrov V.I., Rogova N.V., Ledyayev Ya.M., Serdyukova D.M. Influence of long term therapy with sulphonylurea derivatives on the capacity of the hepatic CYP2C9 enzyme system of drug biotransformation in diabetic type II patients in the city of Volgograd. Vestnik VolgGМУ 2010; 2 (34): 14–18. [in Russian]
2. Бутранова О.И., Раздрогоина Т.Н. Фармакоэпидемиологический анализ антибактериальной терапии инфекций кожи и мягких тканей на фоне сахарного диабета 2 типа. Вестник ВолгГМУ. — 2015. — № 2 (54). — С. 67–70. / Butranova O.I., Razdrogina T.N. Farmakoepidemiologicheskij analiz antibakterial'noj terapii infektsij kozhi i myagkikh tkanej na fone sakharnogo diabeta 2 tipa. Vestnik VolgGМУ 2015; 2 (54): 67–70. [in Russian]
3. Галстян Г.Р., Видулова О.К., Исаков М.А., Железнякова А.В., Серков А.А., Егорова Д.Н., Артемова Е.В., Шестакова М.В., Дедов И.И. Эпидемиология синдрома диабетической стопы и ампутаций нижних конечностей в Российской Федерации по данным Федерального регистра больных сахарным диабетом (2013–2016 гг.). Сахарный диабет. — 2018. — Т. 21. — № 3. — С. 170–177. doi: 10.14341/DM9688 / Galstyan G.R., Vikulova O.K., Isakov M.A., Zheleznyakova A.V., Serkov A.A., Egorova D.N., Artemova E.V., Shestakova M.V., Dedov I.I. Epidemiologiya sindroma diabeticheskoy stopy i amputatsij nizhnikh konechnostey v Rossijskoj Federatsii po dannym Federal'nogo registra bol'nykh sakharnym diabetom (2013–2016 gg.). Sakharnyj diabet 2018; 21: 3: 170–177. doi: 10.14341/DM9688 [in Russian]
4. Клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома диабетической стопы. Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю., Егорова Д.Н. и соавт. Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Костюченко Б.М. — 2015. — Т. 2. — С. 63–83. / Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu sindroma diabeticheskoy stopy. Galstyan G.R., Tokmakova A.Yu., Egorova D.N. i soavt. Rany i ranevye infektsii. Zhurnal im. prof. Kostjuchenka B.M. 2015; 2: 63–83. [in Russian]
5. Приказ Минздрава России от 24.12.2012 N 1434н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при сахар-

- ном диабете с синдромом диабетической стопы (без критической ишемии)». Ссылка активна на 25.03.2019: [http://www.consultant.ru/PrikazMinzdravaRossiiot24.12.2012N1434nObutverzheniistandartaspetsializirovannojmeditsinskojpomoshchipri sakharnomdiabete s sindromom diabeticheskoy stopy \(bez kriticheskoy ishemii\)](http://www.consultant.ru/PrikazMinzdravaRossiiot24.12.2012N1434nObutverzheniistandartaspetsializirovannojmeditsinskojpomoshchipri sakharnomdiabete s sindromom diabeticheskoy stopy (bez kriticheskoy ishemii)). Ssylka aktivna na 25.03.2019: <http://www.consultant.ru> [in Russian]
6. Российские национальные рекомендации «Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России». Под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда, С.В. Яковлева и др. М.: 2012. Rossijskie natsional'nye rekomendatsii «Strategiya i taktika primeneniya antimikrobnykh sredstv v lechebnykh uchrezhdeniyakh Rossii». Pod red. V.S. Savel'ev, B.R. Gel'fand, S.V. Yakovlev i dr. M.: 2012. [in Russian]
7. Приказ от 22 апреля 1985г. N 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Ссылка активна на 25.03.2019: [http://www.consultant.ru/Prikazot22aprelya1985g.N535Obunifikatsii mikrobiologicheskikh \(bakteriologicheskikh\) metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniyakh](http://www.consultant.ru/Prikazot22aprelya1985g.N535Obunifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniyakh). Ssylka aktivna na 25.03.2019: <http://www.consultant.ru> [in Russian]
8. Коребба К.А., Кудыкин М.Н., Минабутдинов А.Р. Полиморфность микрофлоры раневых дефектов у больных с синдромом диабетической стопы. Практическая медицина. — 2015. — № 2 (87). — С. 92–96. / Korejba K.A., Kudykin M.N., Minabutdinov A.R. Polymorphism of wound defects microflora in patients with diabetic foot syndrome. Prakticheskaja medicina 2015; 2 (87): 92–96. [in Russian]
9. Российские национальные рекомендации (2-ое переработанное и дополненное издание) «Хирургические инфекции кожи и мягких тканей». Под редакцией Б.Р. Гельфанда. М.: 2015. / Rossijskie natsional'nye rekomendatsii (2-oe pererabotannoe i dopolnennoe izdanie) «Khirurgicheskie infektsii kozhi i myagkikh tkanej». Pod redaktsiej B.R. Gel'fanda. M.: 2015. [in Russian]
10. Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ (последняя редакция). Ссылка активна на 25.03.2019: [http://www.consultant.ru/Federal'nyjzakonObosnovakhokhranyzdorov'ya grazhdanvRossijskojFederatsiiot21.11.2011N323-FZ\(poslednyayar redaktsiya\)](http://www.consultant.ru/Federal'nyjzakonObosnovakhokhranyzdorov'ya grazhdanvRossijskojFederatsiiot21.11.2011N323-FZ(poslednyayar redaktsiya)). Ssylka aktivna na 25.03.2019: <http://www.consultant.ru> [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузьмина Татьяна Николаевна — ассистент кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии с курсами клинической фармакологии ФУВ, клинической аллергологии ФУВ ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Волгоград

Рогова Наталья Вячеславовна — д. м. н., профессор, профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии с курсами клинической фармакологии ФУВ, клинической аллергологии ФУВ ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Волгоград

Инъекционная наркомания как фактор риска инфекционного эндокардита

*А. И. ДАНИЛОВ, С. Н. КОЗЛОВ, Л. П. ЖАРКОВА, А. В. ЕВСЕЕВ, В. В. МЛАДОВ

ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Injecting Drug Addiction as a Risk Factor for Infective Endocarditis

*A. I. DANILOV, S. N. KOZLOV, L. P. ZHARKOVA, A.V. EVSEEV, V. V. MLADOV

Smolensk State Medical University, Smolensk

В течение последних десятилетий увеличилось количество и изменилось соотношение основных факторов риска инфекционного эндокардита. Среди них ключевую роль играет инъекционная наркомания и другие факторы поражения периферических сосудов. В статье представлены результаты многоцентрового исследования, одной из задач которого было определение структуры факторов риска и возбудителей инфекционного эндокардита с последующим изучением особенностей антимикробной терапии. В исследование были включены пациенты обоего пола всех возрастных групп с определённым или вероятным инфекционным эндокардитом. Проанализировано 406 случаев инфекционного эндокардита.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, структура факторов риска, инъекционная наркомания, антимикробная терапия.

In recent decades, the number and ratio of the main risk factors for infective endocarditis has increased. Among them, injecting drug addiction and other peripheral vascular disease factors play a key role. The article presents the results of a multicenter study with the aim, among other objectives, to determine the structure of risk factors and pathogens of infective endocarditis, followed by the study of the characteristics of antimicrobial therapy. The study included patients of both sexes and all age groups with certain or possible infective endocarditis. 406 cases of infective endocarditis were analyzed.

Keywords: infective endocarditis, structure of risk factors, injecting drug addiction, antimicrobial therapy.

Введение

Согласно данным современных исследований, заболеваемость инфекционным эндокардитом (ИЭ) составляет 3–10 случаев на 100 тыс. человек в год [1, 2].

В течение двух десятилетий увеличилось количество и изменилось соотношение основных факторов риска ИЭ. Наиболее важную роль стали играть инъекционная наркомания и другие факторы, способствующие поражению периферических сосудов [3, 4].

К возникновению ИЭ у «инъекционных наркоманов» способствует сочетание следующих факторов: употребление самодельных наркотических веществ, в которых содержатся твердые частицы, пузырьки воздуха и другие примеси; травма нативных клапанов и пристеночного эндокарда; использование для инъекций нестерильных растворов, что способствует попаданию вирулентной инфекции в кровь; бактериемия; резкое ослабление иммунитета [5].

Клиническими особенностями ИЭ при наличии у пациента в анамнезе инъекционной наркомании являются преимущественно стафилококковая этиология заболевания, трикуспидальная локализация инфекционного процесса, как правило, наличие в анамнезе вирусных гепатитов, вируса иммунодефицита человека, высокий риск развития тромбоэмболии лёгочной артерии [6, 7].

Своевременная диагностика и последующее назначение антибактериальной терапии (АБТ) способствуют кардинальному снижению рисков развития анатомических изменений клапанного аппарата сердца при ИЭ. Вместе с тем, ввиду широкого спектра потенциальных возбудителей, а также частую генерализованного поражения сосудистого русла, и, как следствие, невозможности применения внутривенного пути введения препаратов в течение необходимого по продолжительности курса лечения, адекватное назначение АБТ у данной категории пациентов происходит не всегда [8].

Учитывая вышеизложенное, была поставлена цель — изучить структуру факторов риска, возбудителей и особенности АБТ у пациентов с ИЭ, имеющих инъекционную наркоманию в анамнезе, проживающих в Российской Федерации.

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: E-mail: dr.DanAndr@yandex.ru

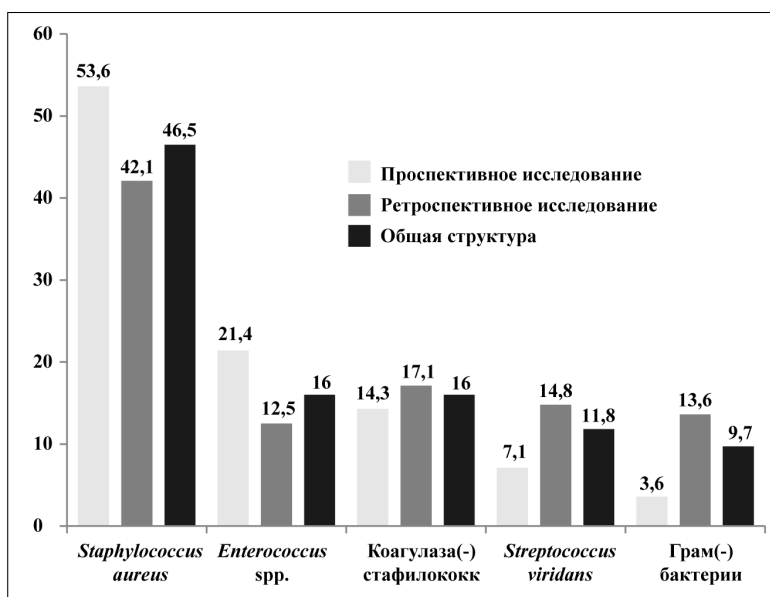


Рис. 2. Структура выделенных микроорганизмов (в %).

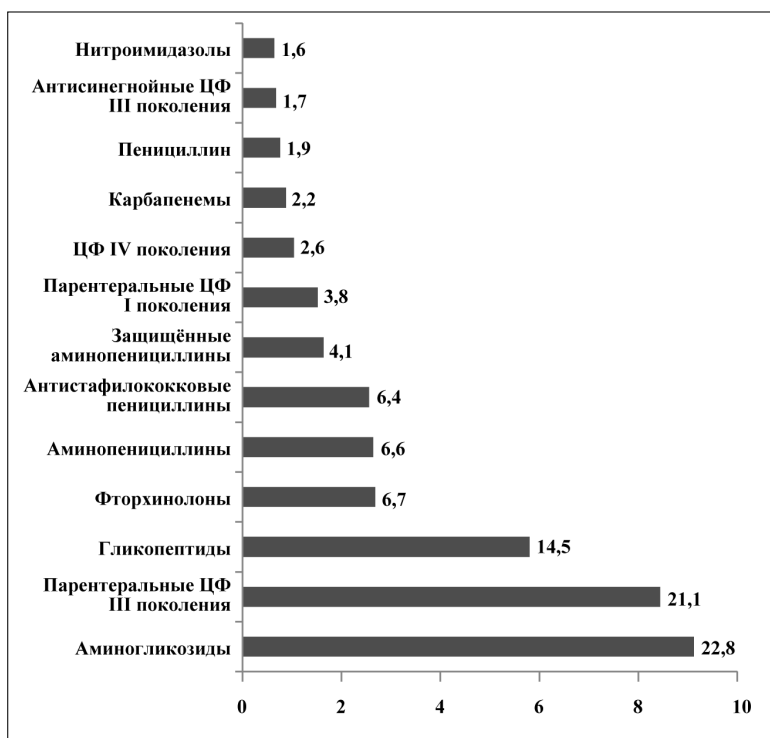


Рис. 3. Структура основных групп антимикробных препаратов при стартовой терапии, %.

(22,1%) и гликопептиды (14,5%). Гораздо реже назначались фторхинолоны (6,7%), незащищенные аминопенициллины (6,6%) и антистафилококковые пенициллины (6,4%). Другие антимикробные препараты назначались в единичных случаях (рис. 3).

В 66,9% случаев стартовая АБТ была изменена. При этом наиболее часто назначались гликопептиды (18,6%), аминогликозиды (15,3%),

фторхинолоны (11,2%) и парентеральные цефалоспорины III поколения (9,5%), (рис. 4).

В условиях лидирующей позиции инъекционной наркомании в структуре факторов риска и *S. aureus* в этиологической структуре ИЭ следует отметить необоснованность частого назначения цефалоспоринов III поколения при стартовой терапии (21,1%) и при её смене (9,5%), поскольку эти препараты не проявляют высокой активности в отношении стафилококков.

Согласно существующим рекомендациям, при выборе аминогликозидов у пациентов с ИЭ предпочтение следует отдавать препаратам I и II поколения [11]. В связи с этим, назначение амикацина, не обладающего необходимой при терапии ИЭ активностью в отношении грамположительных кокков, в ходе стартовой АБТ (2,7%) и при её смене (2,2%) является некорректным.

С учётом увеличения частоты развития бактериемии, вызванной MRSA, проведено достаточно большое количество исследований, в ходе которых изучался вопрос сравнения стандартной схемы (ванкомицин + гентамицин) и даптомицина. Согласно результатам подавляющего большинства этих исследований, даптомицин не уступает по эффективности стандартной схеме и его назначение при бактериемии, вызванной MRSA, является оправданным. Дополнительными его преимуществами являются более быстрый бактерицидный эффект по сравнению с ванкомицином и отсутствие потенциальной нефротоксичности [12]. Низкую частоту назначения данного препарата в Российской Федерации можно объяснить его высокой стоимостью.

Одним из антимикробных препаратов, активных в отношении полирезистентных грамположительных микроорганизмов, является линезолид [13]. При стартовой АБТ он был назначен в 0,3%, при её смене — в 3,6%. Вместе с тем, следует отметить, что данный препарат обладает бактериостатическим действием, что должно приниматься во внимание лечащими врачами в практике его использования.

Парентеральный путь введения антимикробных препаратов при терапии ИЭ является более предпочтительным. Однако, у лиц, длительно имеющих в анамнезе инъекционную наркоманию,

этот путь введения может быть затруднен из-за генерализованного поражения периферических сосудов. В связи с этим, в течение последних лет изучается потенциальная возможность применения перорального пути введения препаратов при АБТ у пациентов с ИЭ. Наиболее часто назначаемыми антимикробными препаратами в данном случае являются аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин), фторхинолоны (ципрофлоксацин), оксазолидиноны (линезолид), а также рифампицин [11, 14].

Длительность АБТ пациентов с ИЭ составляет 4–6 нед., в ряде случаев достигает 8 нед. Вместе с тем, в большинстве стационаров не всегда имеется возможность обеспечить необходимую длительность госпитализации пациентов. Поэтому в настоящее время активно изучается возможность применения парентеральной АБТ у пациентов с ИЭ в амбулаторных условиях. При этом следует отметить, что данный вид терапии имеет ограничения и она допустима лишь тогда, когда у изначально госпитализированного в стационар пациента отмечается положительная клиническая динамика, отсутствуют серьёзные риски развития осложнений и существуют необходимые условия ухода за пациентом в амбулаторных условиях [11, 15].

Заключение

Наркомания в последние годы становится одной из важнейших медицинских и социальных проблем. По данным экспертов в современном мире отмечается непрерывная тенденция к увеличению числа лиц, принимающих наркотические препараты.

За последние десятилетия смертность среди лиц, злоупотребляющих наркотиками, в России возросла в несколько раз. Одним из самых серьёзных осложнений инъекционного употребления наркотиков является развитие ИЭ. Поздняя диагностика во многом определяет тяжёлый прогноз у этих больных и является одной из причин резистентности к АБТ, а также развития осложнений со стороны сердечно-сосудистой и других систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилов А.И., Козлов Р.С., Козлов С.Н., Дехнич А.В. Практика ведения пациентов с инфекционным эндокардитом в Российской Федерации. Антибиотики и химиотер. — 2017. — Т. 62. — № 1–2. — С. 30–34 / Danilov A.I., Kozlov R.S., Kozlov S.N., Dechnich A.V. Praktika vedeniya pacientov s infekcionym ehndokarditom v Rossijskoj Federacii. Antibiotiki i khimioter 2017; 62 (1–2): 30–34. [in Russian]

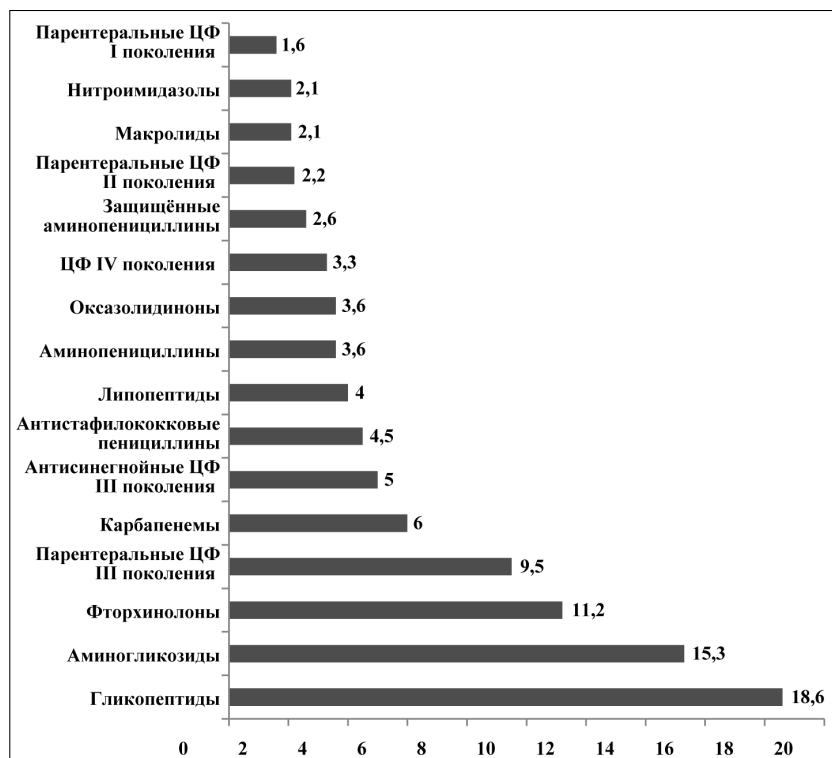


Рис. 4. Структура основных групп антимикробных препаратов при смене схемы терапии (в %).

Причинами несвоевременной диагностики ИЭ у наркоманов являются атипичность и полиморфность клинической картины; позднее разрушение клапанного аппарата с появлением шумов и сердечной недостаточности; различия в характере начала заболевания (внезапное или постепенное); назначение антимикробных препаратов до взятия образцов крови, что устраняет бактериемию и стирает клиническую картину.

Необходимо отметить, что развитие, течение и исход ИЭ у описываемой категории пациентов зависят от вида возбудителя и его вирулентности. Наиболее острое течение отмечается при стафилококковой и грибковой этиологии. Кроме того, в этих случаях наблюдается наибольший риск тромбоэмболических осложнений.

Согласно большинству рекомендаций, эффективность АБТ пациентов с ИЭ во многом определяется её этиотропным характером. В условиях лидирующей позиции *S.aureus* в этиологической структуре ИЭ и значительной доли инъекционной наркомании в структуре факторов риска данной нозологии следует отметить неоправданно низкую частоту назначения в Российской Федерации высокоактивных в отношении данного возбудителя антимикробных препаратов.

2. Erichsen P., Gislason G.H., Bruun N.E. The increasing incidence of infective endocarditis in Denmark, 1994–2011. *Europ J Intern Med* 2016; 35: 95–99.
3. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Власова Е.Е., Данилова Е.М., Дехнич А.В. и соавт. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клин микробиол антимикроб химиотер. — 2015. — № 17 (1). — С. 4–10. / Danilov A.I., Alekseeva I.V., Asner T.V., Vlasova E.E., Danilova

- E.M., Dehnic A.V. i soavt. Jetiologija infekcionnogo jendokardita v Rossii. Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2015; 17 (1): 4–10. [in Russian]
4. *Cancan Gursul N., Vardar I., Demirdal T., Gursul E., Ural S., Yesil M.* Clinical and microbiological findings of infective endocarditis. *J Infect Develop Count* 2016; 10(5): 478–487.
 5. *Гусманов Д.С.* Инфекционный эндокардит у инъекционных наркоманов. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. — 2013. — № 14 (1). — С. 18–25. / *Gusmanov D.S.* Infekcionnyj endokardit u inekcionnyh narkomanov. Byulleten' NCSSKHim. A.N. Bakuleva RAMN 2013; 14 (1): 18–25. [in Russian]
 6. *Пonomareva E.Yu., Rebrov A.P.* Инфекционный эндокардит у пациента, употребляющего наркотики внутривенно. *Клиницист*. — 2011. — № 3. — С. 83–85. / *Ponomareva E.Yu., Rebrov A.P.* Infekcionnyj endokardit u pacienta, upotreblayushchego narkotiki vnutrivvenno. *Klinicist* 2011; 3: 83–85. [in Russian]
 7. *Holland T.L., Arnold C., Jr Fowler V.G. et al.* Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *Journal of American Medical Association* 2014; 312 (13): 1330–1341.
 8. *Данилов А.И., Козлов С.Н.* Общие принципы ведения пациентов с инфекционным эндокардитом. *Клиническая фармакология и терапия*. — 2019. — № 28 (2). — С. 57–60. / *Danilov A.I., Kozlov S.N.* Obshchie principy vedeniya pacientov s infekcionnym endokarditom. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* 2019; 28 (2): 57–60. [in Russian]
 9. *Durack D.T., Lukes A.S., Bright D.K.* New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. *Duke Endocarditis Service. Am J Med* 1994; 96 (3): 200–209.
 10. *Li J.S., Sexton D.J., Mick N., Nettles R., Fowler V.G., Ryan T. et al.* Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2000; 30 (4): 633–638.
 11. *Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorni M.G., Casalta J.P., Del Zotti F. et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Hear J* 2015; 36 (44): 3075–3128.
 12. *Gould I.M., Miro J.M., Rybak M.J.* Daptomycin: the role of high-dose and combination therapy for Gram-positive infections. *Intern J Antimicrob Agents* 2013; 42 (3): 202–210.
 13. *Erwin J.P., Otto C.M.* Infective endocarditis: old problem, new guidelines and still much to learn. *Heart* 2014; 100 (13): 996–998.
 14. *Holland T.L., Arnold C., Jr Fowler V.G. et al.* Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *Journal of American Medical Association* 2014; 312 (13): 1330–1341.
 15. *Keeshin S.W., Feinberg J.* Endocarditis as a marker for new epidemics of injection drug use. *American Journal of Medical Science* 2016; 352 (6): 609–614.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Данилов Андрей Игоревич — к. м. н., ассистент кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Козлов Сергей Николаевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Жаркова Людмила Павловна — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Евсеев Андрей Викторович — д. м. н., профессор, заведующий научно-исследовательским центром, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Младов Владимир Валентинович — биостатистик ЗАО «Биокад»

Влияние митохондриальных субстратов и кофакторов на выработку и состав слёзной жидкости при синдроме сухого глаза профессионального генеза

*Н. К. МАЗИНА¹, С. Г. АНИСИМОВА²

¹ Кировский государственный медицинский университет Минздрава России, Киров

² ООО «Аском», Киров

Influence of Mitochondrial Substrates and Cofactors on Tear Liquid Production and Components in Occupational Dry Eye Syndrome

*N. K. MAZINA¹, S. G. ANISIMOVA²

¹ Department of Pharmacology, Kirov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kirov

² ООО "Askom", Kirov

Среди звеньев патогенеза синдрома «сухого глаза» особо выделяют гипоксию и оксидативный стресс, однако в лечении этого заболевания доминирует слезозаместительная терапия, тогда как стимуляторы выработки слезы и антигипоксанты применяются явно недостаточно. *Цель работы* — изучить влияние препарата, содержащего митохондриальный субстрат и кофакторы окисления, на продукцию и состав слёзной жидкости при синдроме «сухого глаза» профессиональной этиологии. *Материал и методы.* В исследовании участвовали 124 пациента (248 глаз) с синдромом сухого глаза профессионального генеза (сварщики и офисные работники). Пациентов разделили на 4 симметричные группы сравнения: две из которых получали препарат, содержащий янтарную кислоту, рибоксин, никотинамид, рибофлавин, две — плацебо. Препарат и плацебо принимали по 2 таблетки 2 раза в день в течение 25 дней три цикла с перерывом в 1 мес. Оценивали слезопродукцию (проба Ширмера), стабильность слезы (проба Норна) и её состав (по содержанию белка, глюкозы, холестерина, триглицеридов, железа и кальция) до и после каждого цикла, через 6 и 12 мес. после окончания лечения. *Результаты.* У сварщиков и офисных работников исходно была снижена слезопродукция и стабильность слёзной плёнки в 1,5–2,0 раза, уменьшено содержание белка, триглицеридов, холестерина, железа и кальция в 2–3 раза. По мере суммации фармакодинамических эффектов препарата в ходе лечения к окончанию 3-го цикла увеличились слезопродукция и прочность слёзной плёнки, возросло содержание белка, глюкозы, триглицеридов, холестерина, железа и кальция в слёзной жидкости, причём у офисных работников позитивные сдвиги преобладали. *Заключение.* Митохондриальные субстраты и кофакторы корректируют слезопродукцию, свойства и состав слёзной плёнки при синдроме «сухого глаза» профессионального генеза.

Ключевые слова: синдром «сухого глаза», сварщики, офисные работники, слезопродукция, стабильность и состав слёзной жидкости, цитофлавин.

Hypoxia and oxidative stress are especially distinguished among the links in the pathogenesis of the dry eye syndrome, however tear replacement therapy dominates in the treatment of this disease, while tear stimulants and antihypoxants are still not as popular. *The aim of the study* is to investigate the effect of a preparation containing mitochondrial substrate and oxidation cofactors on the production and composition of lacrimal fluid in occupational dry eye syndrome. *Materials and Methods:* 124 patients (office managers and welders) with occupational dry eye syndrome were randomized into 4 symmetric comparison groups. The patients in two of the groups received a medication containing succinic acid, riboxin, nicotinamide, and riboflavin; while the other two groups received placebo. The treatment regimen in all groups consisted of 3 cycles of 2 tablets 2 times per day for 25 days with 1 month break. Schirmer test was used to assess tear production, Norn's test — to control tear stability. Tear composition (proteins, glucose, cholesterol, triglycerides, iron, and calcium levels) was also checked. The tests and tear components assessment were undertaken before and after every cycle, as well as 6 and 12 months after the end of treatment. *Results:* initially, tear production and stability of the tear film were reduced by 1.5–2.0 times in both welders and office workers; the content of protein, triglycerides, cholesterol, iron, and calcium was reduced by 2–3 times. As the pharmacodynamic effects of the drug were summarized during treatment, tear production and tear film strength increased by the end of the 3rd cycle, the content of protein, glucose, triglycerides, cholesterol, iron, and calcium in the lacrimal fluid increased; positive changes prevailed among office workers. *Conclusion:* mitochondrial substrates and cofactors improve tear liquid production, properties and composition of the tear film in the case of occupational dry eye syndrome.

Keywords: dry eye syndrome, welders, office managers, tear production, tear liquid stability and components, cytoflavin.

Введение

Масштабы распространенности синдрома «сухого глаза» (ССГ) не только становятся гло-

бальной проблемой, но расширяют возрастные рамки: если раньше ССГ был типовой офтальмопатологией старшего возраста, то теперь в группы риска попадают молодые офисные сотрудники и даже дети [1]. Официальная информация относительно и не полностью отражает истинную ситуацию, так как более 60% опрошенных, испытыва-

© Н. К. Мазина, С. Г. Анисимова, 2019

*Адрес для корреспонденции: 610998 Киров, ул. Воровского, 78. Кировский ГМУ

ющих симптомы ССГ, не обращаются за специализированной офтальмологической помощью. Распространённость вторичного ССГ в развитых странах составляет до 43% от числа первичных обращений взрослого населения с офтальмопатологией. Все эти обстоятельства вывели ССГ в ранг социально значимой проблемы среди трудоспособного населения и молодежи [1, 2]. ССГ относят к многофакторной офтальмопатологии, сопровождающейся изменениями качественных и количественных показателей слёзопродукции, нарушением стабильности слёзной плёнки. Следствием является образование сухих пятен и прогрессирующих повреждений роговицы [3, 4].

В идеале фармакотерапия патологии должна стремиться к восстановлению полноценной слёзопродукции, структуры и функций роговицы и конъюнктивы. Достигнуть этой цели можно препаратами (системными или местными лекарственными формами), стимулирующими секрецию нативной слёзной жидкости (СЖ). Однако основу современных подходов к лечению ССГ составляют актуальные смазочные материалы (искусственные слёзы или биологические заменители), системные антибиотики, противовоспалительная терапия, диеты (употребление омега-3 жирных кислот, витаминно-минеральных комплексов) [5]. Стимуляция секреции слезы используется редко [6, 7].

Таким образом, поиск препаратов, увеличивающих продукцию СЖ, является перспективным патогенетическим направлением фармакотерапии ССГ. Дальнейший прогресс в рассматриваемой области связан с внедрением лекарств, которые были бы ориентированы на различные патогенетические типы ССГ, стимулирующих и сохраняющих нативную слезу с минимальным использованием инвазивных методов лечения.

В патогенезе ССГ заметную роль, помимо снижения слёзопродукции и стабильности слёзной плёнки [3], играют процессы гипоксии и окислительного стресса [8]. Основными источниками активных форм кислорода являются митохондрии, дисфункция которых относится к типовым патологическим процессам [9]. Однако фармакологические антиоксиданты и антигипоксанты с функцией метаболической энергопротекции пока не заняли достойного места в терапии ССГ [10].

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния метаболитного энергопротектора цитофлавина, содержащего митохондриальные субстраты и кофакторы, на продукцию и состав слёзной жидкости при синдроме «сухого глаза» профессионального генеза.

Материал и методы

В исследование включили 124 пациента (248 глаз) с ССГ профессиональной этиологии в возрасте от 28 до 45 ($33,3 \pm 4,0$) лет, из них 62 (124 глаза) электрогазосварщика ручной сварки и 62 (124 глаза) офисных работника. Профессиональный стаж

работы у сварщиков составил от 10 до 27 ($13,4 \pm 3,5$) лет, офисных работников — от 10 до 27 ($12,5 \pm 2,6$) лет. Аттестация рабочих мест показала, что в 100% случаев у офисных работников присутствуют вредные производственные факторы в виде сенсорных нагрузок и электромагнитного излучения, у электрогазосварщиков ручной сварки — сварочные аэрозоли, ультрафиолетовое излучение с длиной волны до 360 нм. Все работники были случайным образом (рандомизация с помощью генератора случайных чисел) разделены на 4 симметричные независимые группы сравнения, которые набирались во время профилактических осмотров. В группы пациентов, принимающих препарат «Цитофлавин» (ЦФЛ), включили по 31 сварщику и 31 офисному работнику, которые принимали препарат по 2 таблетки 2 раза в день в течение 25 дней, три цикла с перерывом в 1 мес.

ЦФЛ — отечественное лекарственное средство метаболитно-энергопротекторного и нейропротекторного типа, разработанное и производимое ООО «НТФФ «ПОЛИСАН» (Санкт-Петербург), зарегистрированное в России. В 1 таблетке содержится янтарной кислоты 0,3 г; инозина (рибоксина) 0,05 г; никотинамида 0,025 г, рибофлавина 0,005 г. В группы контроля вошли по 31 работнику каждой профессии. В качестве активного плацебо они принимали аскорбиновую кислоту (по 0,05 г в таблетке) по аналогичной схеме. Группа здоровых добровольцев состояла из 20 человек (40 глаз) в возрасте от 18 до 22 ($21 \pm 0,3$) лет (10 лиц мужского пола и 10 лиц женского пола), с отсутствием соматической и офтальмологической патологии.

В группах сравнения и у здоровых добровольцев оценивали слёзопродукцию, стабильность слёзной плёнки и состав СЖ каждые три цикла и спустя 6 и 12 мес. после окончания приёма препарата.

Величину общей слёзопродукции определяли по показателю «проба Ширмера» I (ПШ, мм), стабильность слёзной плёнки — по «пробе Норна» (ПН, сек). Состав слёзной жидкости (СЖ) изучали на автоматическом компактном биохимическом анализаторе Cobas c111 (Roche Diagnostics, Швейцария). Забор слезы осуществляли с помощью тест-полосок для пробы Ширмера (Bausch and Lomb, США), затем элюировали 0,25 мл стерильного изотонического 0,9% водного раствора натрия хлорида и определяли следующие биохимические показатели: содержание общего белка (ОБ, г/л), альбумина (Альб, г/л), глюкозы (Гл, ммоль/л), триглицеридов (Тг, ммоль/л), холестерина (Холест, ммоль/л), железа (Жел, мкмоль/л), кальция (Кальц, ммоль/л).

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ StatSoft Statistica v.10,0 [11]. Использовали непараметрический критерий оценки статистической значимости межгрупповых различий Манна–Уитни вне зависимости от характера распределения. Цифровые значения функциональных показателей в таблицах представлены в формате $M(SD)$, где M — средняя арифметическая, SD — среднеквадратичное отклонение, а на графиках — в формате M (95% доверительный интервал, ДИ). Критический уровень значимости составил 0,05.

Оценку множественных связей и направленность взаимодействий между показателями-откликами (ОШ, ПН, ОБ, Альб, Глю, Холест, Тг, Жел, Кальц) и факторами влияния (фармакологическое воздействие ЦФЛ, время наблюдения, профессиональная принадлежность) осуществляли с помощью многомерного факторного анализа методом главных компонент (ГК), который реализовали поэтапно в модуле Principal components & Classification Analysis пакета программ STATISTICA 10,0. [11].

Результаты исследования

Перед началом приёма препарата ЦФЛ у офисных работников и сварщиков отмечали снижение (более чем в 1,5 раза, $p=0,00...$) выработки СЖ средней степени и стабильности слёзной плёнки

Значения показателей, отражающих слёзопroduкцию, качество и состав слезы в группах сравнения до назначения цитофлавина и плацебо по сравнению со здоровыми добровольцами

Показатель	Здоровые добровольцы (n=40)	Офисные работники (n=124)	p	Сварщики (n=124)	p	p ₁
ПШ, мм	18,22(1,4)	8,34(2,44)	0,00...	8,83(1,8)	0,00...	0,091
ПН, сек	15,84(0,28)	7,17(1,09)	0,00...	7,44(0,98)	0,00...	0,092
ОБ, г/л	2,76(0,22)	1,10(0,34)	0,00...	1,1(0,39)	0,00...	0,082
Альб, г/л	1,17(0,09)	0,37(0,21)	0,00...	0,44(0,19)	0,00...	0,005
Глюк, ммоль/л	0,03(0,000..)	0,03(0,01)	0,172	0,028(0,01)	0,00...	0,48
Тг, ммоль/л	0,20(0,02)	0,12(0,09)	0,00...	0,13(0,03)	0,00...	0,011
Холест, ммоль/л	0,03(0,000..)	0,021(0,01)	0,00...	0,021(0,005)	0,00...	0,910
Жел, мкмоль/л	9,84(0,72)	3,9(1,34)	0,00...	4,4(1,37)	0,00...	0,005
Кальц, ммоль/л	0,13(0,01)	0,05(0,02)	0,00...	0,05(0,02)	0,00...	0,439

Примечание. n – количество глаз в группах сравнения, значения показателей представлены в формате $M(SD)$; где M – среднее значение показателя; SD – среднее квадратичное отклонение; p – уровень статистической значимости различий между группами до лечения и здоровыми добровольцами по непараметрическому критерию Манна–Уитни; p_1 – уровень статистической значимости различий между группами сварщиков и офисных работников до начала лечения.

по сравнению со здоровыми добровольцами (таблица), что подтверждало диагноз ССГ, поставленный при профосмотре. Состав СЖ у представителей обеих групп сравнения также существенно и статистически значимо отличался от такового у здоровых добровольцев по всем биохимическим показателям, кроме содержания глюкозы — у офисных работников. По большинству исследованных нами свойств слезная жидкость до начала исследования у сварщиков и офисных работников не различалась, хотя содержание альбумина, триглицеридов и железа в СЖ сварщиков было исходно незначительно выше (на 19, 8 и 13, соответственно, $p < 0,05$), чем у офисных работников.

После назначения ЦФЛ и активного плацебо оценивали слёзопroduкцию, стабильность слезной плёнки и состав СЖ каждые три цикла и спу-

стя 6 и 12 мес. после окончания приёма препарата. В конце исследования образовалась совокупность данных, состоящая из 15624 цифровых значений, которые были сгруппированы в соответствии с факторами влияния: «профессия» (сварщики и офисные работники), «наблюдение» (7 точек мониторинга) и «воздействие» (препарат ЦФЛ и плацебо). С выделением группирующих переменных и совокупности показателей-откликов автоматически была сформирована многомерная корреляционная матрица. В методе главных компонент (ГК) количество выделяемых латентных переменных, характеризующих неявные системные связи, равно количеству параметров-откликов (рис. 1).

Это позволило охватить все факторное пространство (полный набор комбинаций уровней трёх

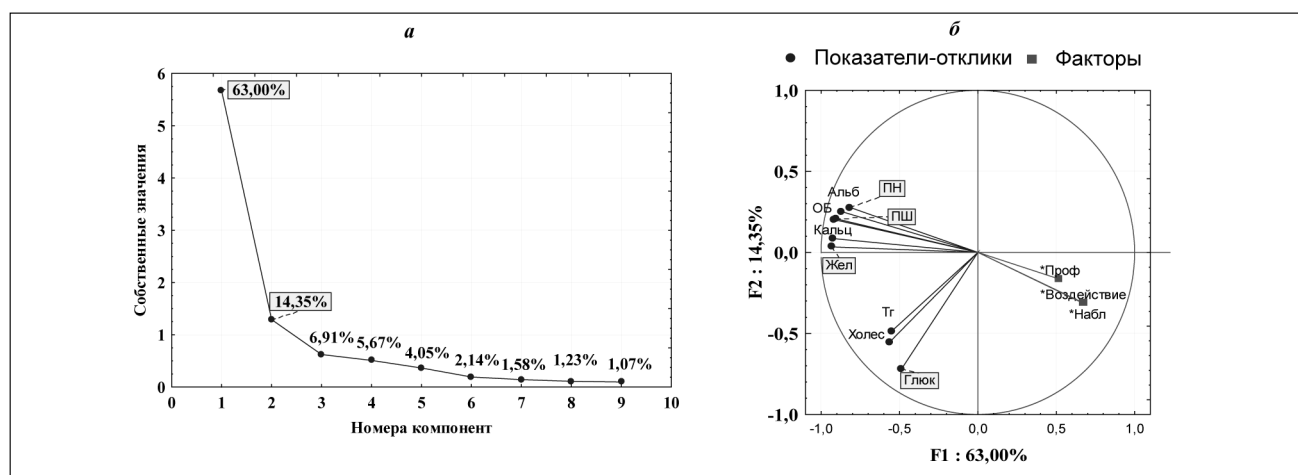


Рис. 1. Выделение ведущих латентных переменных — главных компонент F_1 и F_2 по критерию Кеттеля в зависимости от поглощения общей дисперсии (а) и определение весовых нагрузок показателей слёзопroduкции, качества и состава СЖ, и группирующих параметров на F_1 и F_2 (б) при множественных корреляциях трёх факторов влияния («длительность наблюдения» — Набл.; «профессия» — Проф.; «фармакологическое воздействие ЦФЛ» — Воздействие) и показателей-откликов (проба Ширмера — ПШ; ПН — проба Норна; содержание общего белка — ОБ; альбумина — Альб.; глюкозы — Глю.; триглицеридов — Тг.; холестерина — Холест.; железа — Жел.; кальция — Кальц.).

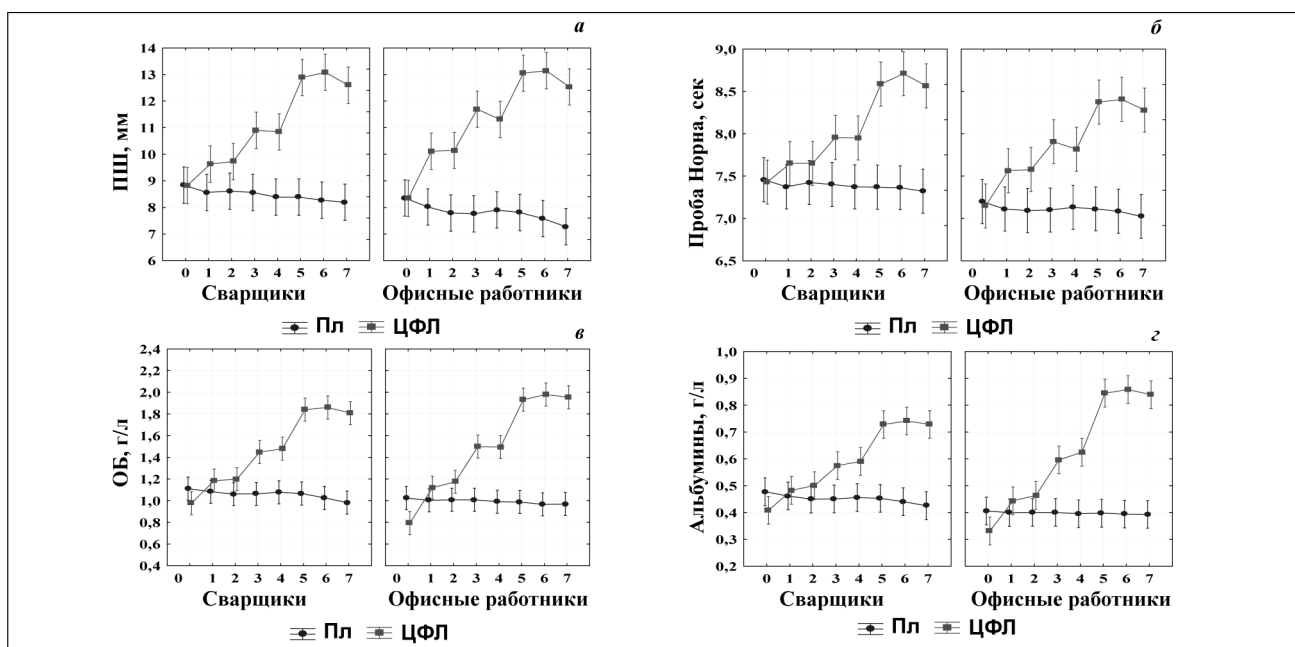


Рис. 2. Изменение слёзопродукции (а), свойств СЖ (б) и содержания белка (в, г) в зависимости от типа фармакотерапии и профессиональной принадлежности пациентов с ССГ.

Обозначения: оси ординат — значения показателей откликов; ось абсцисс — время наблюдения с указанием моментов оценки значений показателя—отклика: 0 — начало наблюдения; 1 — первый курс приёма ЦФЛ и плацебо в течение 25 дней; 2 — время перерыва в приеме препаратов 1 месяц; 3 — второй курс приема ЦФЛ и плацебо в течение 25 дней; 4 — время перерыва в приеме препаратов 1 месяц после второго курса приема препаратов; 5 — третий курс приема ЦФЛ и плацебо в течение 25 дней; 6 — время 6-ти месячного перерыва приема ЦФЛ и плацебо; 7 — время 12-месячного перерыва от третьего курса приема ЦФЛ и плацебо; квадратными точками обозначены значения в группах ЦФЛ; круглыми точками обозначены значения в контрольных группах. Вертикальные линии по обе стороны точки указывают 95% ДИ.

факторов, доступных в нашем исследовании) и оценить силу их взаимодействия. В процессе факторизации (анализа множества попарных корреляций) выделили латентные переменные F_{1-9} , поглощавшие 100% дисперсии (вариабельности) массива данных и минимальное количество наиболее тесных корреляций (ГК), поглощающее 70% и более дисперсии массива, согласно критериям качества и достоверности представительства математико-статистических моделей, принятым в многомерном статистическом анализе [11]. При изучении влияния ЦФЛ на продукцию и состав СЖ выделились два главных компонента с выполнением условия $F_1 + F_2 > 70\%$ ($F_1 + F_2 = 77,35\%$), что характеризовало полноту и достоверность их общности, причём ведущая компонента F_1 соответствовала соотношению $F_1 > F_2$ (рис. 1, а).

Согласно весовым нагрузкам (максимально сильным связям) параметров-откликов на F_1 и F_2 наиболее информативными признаками, характеризующими влияние ЦФЛ, по величине проекций на ГК (рис. 1, б), превышающими значение 0,5 оказались все показатели, кроме Глю.

Наибольшее влияние на слёзопродукцию и состав СЖ (компонента F_1) оказывали факторы фармакологического воздействия в виде ЦФЛ (фактор «воздействие») и длительности его при-

менения (фактор «наблюдение»). Влияние профессиональной принадлежности (фактор «профессия») было значимым и удовлетворяло критерию качества и достоверности представительства 0,5, хотя и было менее выражено. Таким образом использованные в данной работе показатели слёзопродукции, прочности слёзной плёнки и состава слезы обладали высокой информативностью и адекватно характеризовали клиническую эффективность фармакологической коррекции ССГ.

Характер изменчивости показателей-откликов зависел от длительности фармакотерапии ЦФЛ и профессиональной принадлежности работников с ССГ. Если исходно профессиональные внутригрупповые и межгрупповые различия показателей слёзопродукции, свойств и состава СЖ были малосущественны и статистически почти не различались (таблица), то по мере суммации фармакодинамических эффектов ЦФЛ в процессе лечения ССГ у пациентов проявились устойчивые тенденции к увеличению значений всех показателей, которые к окончанию третьего цикла приема препарата приобрели существенные и статистически значимые различия между группами сравнения (рис. 2—4).

Степень коррекции нарушений слезопродукции (рис. 2, а), стабильности слезы (рис. 2, б) и

содержание общего белка (рис. 2, в) и альбуминов (рис. 2, г) последовательно возрастали при повторном применении ЦФЛ от начала первого до окончания 3-го цикла приёма.

В течение каждого цикла происходило нарастание значений показателей-откликов ПШ, ПН, ОБ, Альб, тогда как в периоды перерывов их значения стабилизировались (рис. 2). После 3-го цикла приёма препарата ЦФЛ зафиксировали достоверное увеличение значений ПШ, ПН, ОБ и Альб по сравнению с контрольной группой: у сварщиков — на 53, 17, 73 и 62% ($p=0,000...$); у офисных работников — на 69, 18, 98 и 110%, ($p=0,000...$), соответственно. Через 6–12 мес. после окончания приёма препарата слёзопродукция и содержание белков в СЖ либо сохранялись на достигнутом уровне, либо незначительно снижались, что свидетельствовало об устойчивости клинической эффективности фармакологической энергопротекции.

С первого по третий цикл приёма препарата в СЖ пациентов с ССГ отметили неуклонную тенденцию к росту содержания холестерина и триглицеридов (рис. 3, а, б).

После окончания 3-го цикла приёма ЦФЛ у сварщиков и офисных работников концентрация этих соединений статистически достоверно на 20–33% превышала таковую в контрольной группе. Спустя 6 мес. после прекращения приёма препарата содержание холестерина и триглицеридов незначительно увеличилось и ещё в течение 6 мес. оставалось практически без изменений. Напротив, содержание глюкозы в СЖ сварщиков стремительно нарастало и к концу 3-го цикла приёма ЦФЛ было на 40% выше ($p=0,000...$), чем в контрольной группе. У офисных работников рост содержания глюкозы за это время в СЖ был несколько менее выраженным и составил 35%, $p=0,002$ (рис. 3, в).

Изменчивость содержания катионов железа и кальция в СЖ пациентов при ССГ также зависела от типа фармакотерапии и их профессиональной принадлежности (рис. 4).

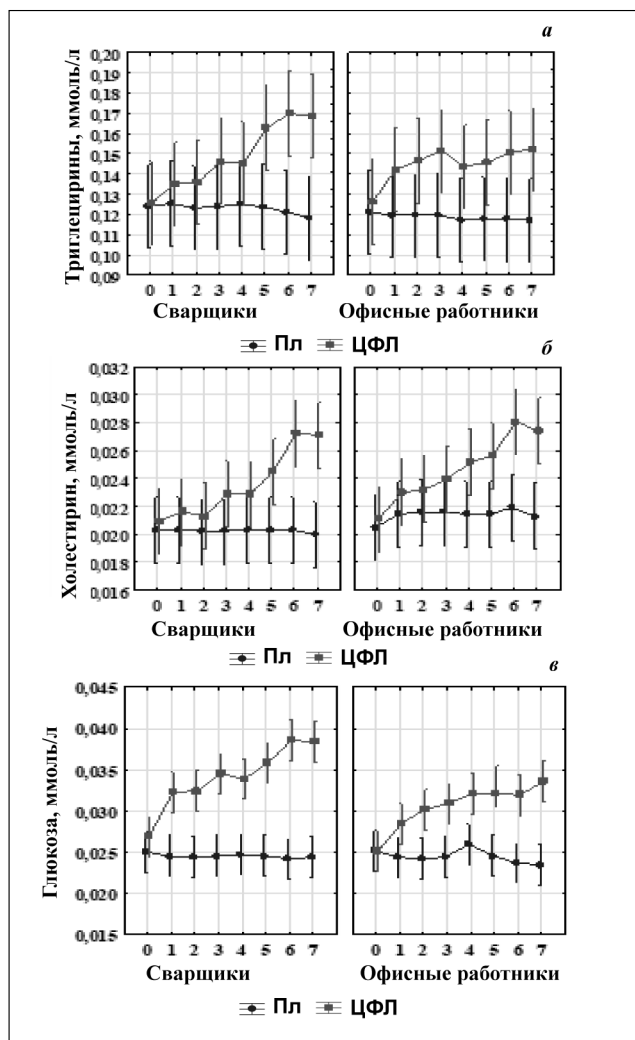


Рис. 3. Изменение содержания холестерина (а), триглицеридов (б) и глюкозы (в) в СЖ в зависимости от типа фармакотерапии и профессиональной принадлежности пациентов с ССГ.

Обозначения: ось ординат — значения показателей-откликов. Остальные обозначения как на рис. 2.

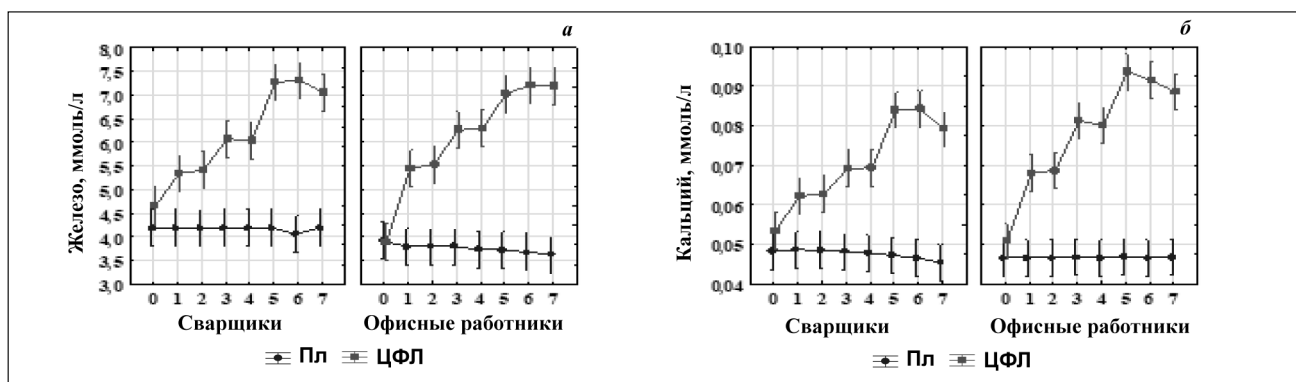


Рис. 4. Изменение содержания железа (а) и кальция (б) в СЖ в зависимости от типа фармакотерапии и профессиональной принадлежности пациентов с ССГ (сварщиков — слева, офисных работников — справа). **Обозначения:** ось ординат — значения показателей-откликов. Остальные обозначения как на рис. 1.

К окончанию 3-го цикла приёма ЦФЛ концентрация железа (рис. 4, а) в СЖ сварщиков повысилась на 71% ($p=0,000...$), у офисных работников — на 86% ($p=0,000...$). За этот же период концентрация кальция (рис. 4, б) у сварщиков увеличилась на 60% ($p=0,000...$), у офисных работников — на 102% ($p=0,000...$) по сравнению с контрольной группой, принимавшей плацебо.

Таким образом по мере суммации фармакодинамических эффектов ЦФЛ в процессе лечения тремя 25-дневными циклами с перерывами в 30 дней у сварщиков и офисных работников с ССГ наблюдали статистически значимое повышение величины слёзопродукции (ПШ), стабильности слёзной плёнки (ПН) и увеличение концентрации белкового (ОБ, Альб), углеводного (Глю), липидного (Тг, Холест) и микроэлементного (Жел, Кальц) состава СЖ.

После 3-го курса приёма ЦФЛ величина слёзопродукции, прочность слёзной плёнки и состав СЖ в группе офисных работников и сварщиков по всем показателям различались незначительно, но приближалась к значениям здоровых добровольцев. Вероятно, для дальнейшей успешной коррекции нарушений слёзопродукции потребуются более длительное профилактическое назначение энергопротектора ЦФЛ.

Профессиональную специфику изменчивости показателей-откликов на протяжении 3 циклов приёма ЦФЛ и конечного уровня значений

можно объяснить тем, что офисные работники при работе на компьютерном оборудовании испытывают действие синего света и постоянное зрительное напряжение, проявляющееся привычно-избыточным напряжением и спазмом аккомодации, а сварщики подвержены преимущественно ультрафиолетовому излучению и дополнительному действию сварочных аэрозолей, способных вызывать более глубокие нарушения слёзопродукции и повреждение слёзной плёнки. С одной стороны, обе профессиональные группы подвержены сходным факторам патогенеза, сопряжённым с воздействием свободных радикалов, против которых активны митохондриальные компоненты ЦФЛ сукцинат, рибофлавин, рибоксин и никотинамид, как антигипоксанта и антиоксиданты [8], однако у сварщиков специфические профессиональные факторы, вероятно, способны вызывать более глубокие нарушения слёзопродукции и повреждение слёзной плёнки.

Заключение

Митохондриальный субстрат и антиоксидант янтарная кислота и кофакторы биологического окисления и энергопродукции, содержащиеся в препарате «Цитофлавин», благотворно влияют на состав слёзной жидкости при синдроме «сухого глаза» профессионального генеза и способствуют восстановлению слёзопродукции и стабильности слёзной плёнки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бржеский В.В. Синдром «сухого глаза» у детей: современные возможности диагностики и лечения. Российская педиатрическая офтальмология. — 2017. — № 12 (2). — С. 73–81. <http://dx.doi.org/10.18821/19931859-2017-12-2-73-81>. / Brzheskij V.V. Sindrom «sukhogo glaza» u detej: sovremennye vozmozhnosti diagnostiki i lecheniya. Rossijskaya pediatričeskaya oftalmologiya 2017; 12 (2): 73–81. <http://dx.doi.org/10.18821/19931859-2017-12-2-73-81>. [in Russian]
2. Бржеский В.В. Синдром «сухого глаза» — болезнь цивилизации: современные возможности диагностики и лечения. Медицинский совет. — 2013. — № 3–1. — С. 114–116. / Brzheskij V.V. Sindrom «sukhogo glaza» — bolezn' tsivilizatsii: sovremennye vozmozhnosti diagnostiki i lecheniya. Meditsinskij sovet 2013; 3–1: 114–116. [in Russian]
3. Pflugfelder S.C., Paiva C. The pathophysiology of dry eye disease: What we know and future directions for research. Ophthalmology 2017 November; 124 (11 Suppl): S4–S13. <http://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.07.010>
4. Lee C.Y., Chen H.C., Sun C.C., Lin H.Y., Lu K.H., Huang J.Y., Yeh C.B., Yang S.F. Gout as a Risk Factor for Dry Eye Disease: A Population-Based Cohort Study. J Clin Med 2019; 8: 62: 2–11. <http://doi.org/10.3390/jcm8010062>
5. Сафонова Т.Н., Гладкова О.В., Новиков И.А., Боев В.И., Федоров А.А. Новые подходы к лечению сухого кератоконъюнктивита. Вестник офтальмологии. — 2017. — № 2. — С. 74–80. <http://doi.org/10.17116/oftalma2017133275-81>. / Safonova T.N., Gladkova O.V., Novikov I.A., Boev V.I., Fedorov A.A. Novye podkhody k lecheniyu sukhogo keratokonyunktivita. Vestnik oftalmologii 2017; 2: 74–80. <http://doi.org/10.17116/oftalma2017133275-81>. [in Russian]
6. Keating G.M. Diquafosol ophthalmic solution 3%: a review of its use in dry eye. Drugs 2015; 75: 8: 911–922.
7. Ушакова Л.И., Балалин С.В., Загребин В.Л. Стимуляция базальной секреции в лечении синдрома «сухого глаза». Офтальмология. — 2019. — № 16 (1). — С. 70–75. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2019-1-70-75>. / Ushakova L.I., Balalin S.V., Zagrebina V.L. Stimulyatsiya bazal'noj sekrecii v lechenii sindroma «sukhogo glaza». Oftalmologiya 2019; 16 (1): 70–75. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2019-1-70-75>. [in Russian]
8. Min J.H., Lee C.H., Ji Y.W., Yeo A., Noh H., Song I. et al. Activation of Dll4/Notch Signaling and Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha Facilitates Lymphangiogenesis in Lacrimal Glands in Dry Eye. PLoS ONE (2016); 11 (2): 1–15. e0147846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147846>
9. Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N. et al. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies // Current Drug Targets 2011; 12 (6): 800–826.
10. Анисимова С. Г., Мазина Н. К., Абрамова Т. В. Коррекция проявлений синдрома «сухого глаза» профессиональной этиологии с помощью комплекса митохондриальных субстратов и кофакторов. Саратовский научно-медицинский журнал. — 2018. — № 14 (4). — С. 799–804. / Anisimova S. G., Mazina N. K., Abramova T. V. Korrektsiya proyavlenij sindroma «sukhogo glaza» professional'noj etiologii s pomoshch'yu kompleksa mitokhondrial'nykh substratov i kofaktorov. Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal 2018; 14 (4): 799–804. [in Russian]
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медисфера, 2006. — 312 с. / Rebrova O.Yu. Statisticheskij analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA. M.: Medisfera, 2006; 312. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мазина Надежда Константиновна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО «Кировский ГМУ» Минздрава России, Киров. ORCID ID: 0000-0003-2998-4050

Анисимова Светлана Геннадьевна — заочный аспирант кафедры фармакологии, врач-офтальмолог, фармакологии ФГБОУ ВО «Кировский ГМУ» Минздрава России, Киров. ORCID ID: 0000-0003-3579-0180

Оценка эффективности неспецифических средств медицинской защиты в отношении заболевания, вызванного вирусом Эбола

Т. Е. СИЗИКОВА, В. Н. ЛЕБЕДЕВ, А. А. ПЕТРОВ, *С. В. БОРИСЕВИЧ

ФГБУ 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации, *Сергиев Посад*

Evaluation of the Effectiveness of Nonspecific Medical Protection Against Disease, Caused of Ebola Virus

T. E. SIZIKOVA, V. N. LEBEDEV, A. A. PETROV, *S. V. BORISEVICH

FSBI 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, *Sergiev Posad*

Представлен анализ исследований по оценке эффективности неспецифических средств экстренной профилактики и лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола. Рассмотрены наиболее значимые результаты доклинических и клинических испытаний неспецифических средств медицинской защиты в отношении возбудителя геморрагической лихорадки Эбола, а также перспективы их использования в практике здравоохранения в настоящее время. Установлено, что общей тенденцией создания неспецифических средств профилактики и лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола, является не разработка новых препаратов, а попытки выявления противовирусной активности уже известных препаратов, ранее имевших иное целевое назначение. В качестве наиболее эффективного НМСЗ в отношении заболевания, вызванного вирусом Эбола, рассматривается фавипиравир.

Ключевые слова: вирус Эбола, геморрагическая лихорадка, лекарственные средства, препараты широкого спектра действия, экстренная профилактика и лечение, фавипиравир, интерферон, доклинические испытания, клинические испытания.

The article presents an analysis of research evaluating the effectiveness of nonspecific means of emergency prevention and treatment of Ebola virus disease. It considers the most significant results of preclinical and clinical trials of nonspecific therapeutics for the causative agent of Ebola hemorrhagic fever, as well as the prospects for their use in healthcare practice at present. It has been established that the general tendency to create nonspecific means of prevention and treatment of Ebola virus disease is not the development of new drugs, but the attempts to detect the antiviral activity of already known drugs that previously had a different purpose. Favipiravir is considered as the most effective nonspecific therapeutic against Ebola virus disease.

Keywords: Ebola virus, hemorrhagic fever, therapeutic, broad-spectrum drugs, emergency prevention and treatment, favipiravir, interferon, preclinical trials, clinical trials.

Стратегия проведения доклинических испытаний противовирусных препаратов традиционно включает этапы оценки эффективности в культуре клеток и на лабораторных животных [1], адекватно воспроизводящих симптомы заболевания человека. По отношению к заболеванию, вызванному вирусом Эбола, в качестве лабораторных животных, адекватно воспроизводящих симптомы заболевания человека, используют низших приматов [2, 3].

При проведении доклинических испытаний препаратов против заболевания, вызываемого вирусом Эбола, используют различного класса неспецифические средства профилактики и лечения заболевания (табл. 1).

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11. ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. E-mail: 48cnii@mil.ru

Как следует из представленных данных, при поиске новых эффективных средств против заболевания, вызываемого вирусом Эбола отчетливо прослеживается тенденция к использованию уже известных не только противовирусных препаратов широкого спектра действия, но и препаратов, используемых для лечения других неинфекционных заболеваний человека (торемифен, амида-рон, кломифен, сертралин, бепридил).

При испытаниях противовирусных препаратов защитный эффект *in vivo* отмечен для препаратов, обладающих ингибирующим эффектом *in vitro*. Обратная зависимость соблюдалась не во всех случаях. Представленные в табл. 2 результаты подтверждают указанную закономерность, а именно: сочетание противовирусного действия *in vitro* и *in vivo* для торемифена, сертралина, бепридила, фавипиравира, интерферона-γ2b, при от-

Таблица 1. Перечень изученных неспецифических средств профилактики и лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола

Название препарата (синонимы)	Назначение препарата	Возможный механизм противовирусного действия	Источник
Фавипиравир (Т-705)	Противовирусные средства	Селективное ингибирование вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы	1, 4–6
Бринцидофовир (СМХ-001)		Нарушение функциональной активности вирусной РНК-полимеразы	7
Иммуциллин (ВСХ4430)		Блокирование вирусной РНК-полимеразы посредством разрыва цепи и включения в РНК	8
ЖК-05		Ингибитор вирусной РНК-полимеразы	9
Ретиназон		Блокирование репродукции вируса вследствие активации внутригенных и экзогенных элементов, препятствующих процессу гликозилирования	10
Рибавирин		Интерференция с вирусной РНК-полимеразы	11
Тилорон		Ингибирование ДНК-полимеразы	12
1Е7-03 (протеин-фосфатаза 1)		Снижение уровня фосфорилирования белка VP30 вируса Эбола, что приводит к супрессии репродукции вируса в клетке	13
Ламивудин		Снижение уровня активности белка VP30 вируса Эбола, что останавливает процесс репродукции вируса в клетке	14
Тетрандрин	Противовоспалительное средство	Блокирование входа вируса в клетки	15
Амодиахин	Противомалярийные средства	Блокирование входа вируса в клетки	12
Хлороквин		Ингибирует вход вируса в клетки, возможно посредством интерференции с факторами определяющими данный процесс эндосомальной мембраны	12
Амиодарон	Противоаритмическое средство	Непрямое ингибирование, включающее изменение клеточных структур чувствительных клеток	12
Кломифен	Антиэстрогенное средство	Ингибирование поздней стадии входа вируса в клетку	12
Сертралин	Антидепрессант		12
Бепридил	Противоаритмическое средство		12
Азитромицин	Антибактериальное средство	Ингибирование синтеза вирусспецифических белков	12
Торемифен	Антиэстрогенное средство	Ингибирует вход вируса в клетки	12
Интерферон- γ 2b	Препараты интерферона	Активирует макрофаги фенотипа M1, обладающие противовирусным действием	16
Интерферон- α конъюгированный с альбумином		Подавление синтеза вирусспецифических белков	17
Интерферон- β конъюгированный с альбумином			18
Интерферон- α рекомбинантный			12, 17
Интерферон- β рекомбинантный			12, 18

сутствии достоверного эффекта при испытаниях *in vivo* для других рассмотренных препаратов.

При испытаниях на мышах защитный эффект показан для фавипиравира, бринцидофовира, GS 5734 и рекомбинантного ИФН- α 2b. Положительный эффект при испытании интерферонов (ИФН- β , рекомбинантный ИФН- α 2b) на низших приматах (макаки резус, яванские макаки) был выражен только в виде увеличения продолжительности срока жизни, снижения вирусемии на фоне 100% их гибели [17, 18]. Необходимо отметить, что возможность успешного применения интерферонов для лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола, ограничена тем, что структурные белки VP24 и VP35 вируса Эбола ингиби-

руют хозяйскую систему продукции интерферона и снижают его противовирусное действие [34].

Испытания противовирусной эффективности препаратов *in vitro* и *in vivo* далеко не всегда подтверждают сведения, об успешном использовании при лечении заболевания. Так, осенью 2014 г. продемонстрировано успешное лечение заболевания, вызванного вирусом Эбола, ламивудином, препаратом, который ранее применялся для лечения СПИДа и гепатита В. При лечении ламивудином выздоровели 13 из 15 больных с диагнозом ЗВВЭ [35].

Y. Cong и соавт. [35] провели изучение противовирусной активности ламивудина и другого препарата, использовавшегося при лечении ретрови-

Таблица 2. Результаты оценки эффективности неспецифических медицинских средств защиты в отношении заболевания, вызванного вирусом Эбола

Препарат	Используемая доза препарата в культуре клеток, мкг/кг	Оценка ингибирования репродукции вируса <i>in vitro</i> , %	Используемая доза препарата при введении животным, мг/кг	Продолжительность введения (кратность) препарата при введении животным	Уровень защитной эффективности препарата на животных (вид), %	Источник
Торемифен	10	90	1	7 сут. (1 раз в день)	50 (белые мыши)	19
Амодиахин	100		100		0 (белые мыши)	20, 21
Амиодарон	200		50		0 (белые мыши)	21, 22
Хлороквин	50		40		0 (морские свинки, белые мыши)	23, 24
Кломифен	10	>90	5	5 сут. (1 раз в день)	0 (белые мыши)	19
Сертралин	10				50 (белые мыши)	22
Бепридил	40		20	9 сут. (1 раз в день)		21
Фавипиравир	10					1, 5, 6, 15
Бринцидофовир	5		10	7 сут. (1 раз в день)	100 (белые мыши)	25–27
GS-5734	10					28, 29
Азитромицин	1000		100		От 10 до 60 (белые мыши)	30
Интерферон-γ2b					100 (белые мыши), 0 (макаки резусы)	31
ИФН-β рекомбинантный, антитела к ИФН-α	—	—	50 мг/м ²	7 сут.	0 (макаки резусы)	32
Рекомбинантный ИФН-α2b					0 (яванские макаки)	18, 33

Примечание. При испытаниях *in vitro* использовали инфицирующие дозы 0,1–1,0 БОЕ на клетку. Инфицирующая доза вируса Эбола при оценке защитного эффекта препаратов *in vivo* составляла $1,0 \times 10^3$ БОЕ на животное (при испытаниях на мышах, морских свинках и низших приматах).

Таблица 3. Результаты оценки эффективности неспецифических средств защиты при лечении заболевших лихорадкой Эбола

Препарат	Препарат, схема введения	Число испытуемых, человек	Продолжительность лечения, сут.	Летальность заболевания	Источник
Фавипиравир	Начальная доза 6000 мг, затем по 2400 мг ежедневно для взрослых (для детей с учётом массы тела)	126	9	20% — в опытной группе, 30% — в группе без лечения	6
	Начальная доза 800 мг, затем по 600 мг ежедневно	39 в опытной группе, 85 в контрольной	3–11 сут. или до выздоровления	45,6% — в опытной группе, 64,7% — в контрольной группе ($p=0,027$)	36
Фавипиравир + плазма реконвалесцентов	Начальная доза 50 мг/кг, затем поддерживающая доза 25 мг/кг + плазма реконвалесцентов однократно	1	Н.д.	Больной выздоровел	41
Бринцидофовир + плазма реконвалесцентов	Начальная доза 200 мг в 6-й день, затем по 100 мг в 9, 13 и 16 день (дважды в неделю) + в 8-й день вводится однократно плазма реконвалесцентов	1	Н.д.	Больной выздоровел	26
Интерферон-β-1α	Введение от 2-х до 17 доз интерферона по 30 мкг	9	До первого отрицательного результата выявления РНК в ОТ-ПЦР-РВ	33,3% — в опытной группе, 81% — в группе без лечения	39

русных инфекций — зидовудина. Установлено, что при множественности инфицирования 1 БОЕ на клетку ламивудин и зидовудин не оказывают влияние на репродукцию вируса Эбола в культурах клеток Vero E6, Hep, G2, HeLa и первичной культуре макрофагов моноцитов человека. При множественности инфицирования 0,1 БОЕ на клетку ламивудин и зидовудин имели лишь незначительный противовирусный эффект [32]. Комбинация ламивудина и зидовудина не показала синергический

противовирусный эффект на морских свинках [35].

Таким образом, доклинические испытания противовирусной эффективности ламивудина и зидовудина в отношении вируса Эбола дали отрицательный результат. В связи с этим достоверность терапевтического эффекта указанных препаратов при лечении больных требует дальнейшего подтверждения. В последующем была изучена эффективность лекарственных препаратов в клинике. Результаты использования неспецифи-

ческих средств защиты при лечении заболевших лихорадкой Эбола, представлены в табл. 3. Как следует из результатов, представленных в табл. 3, наиболее эффективным лечебным действием из испытанных препаратов обладает фавипиравир (при использовании как в виде монопрепарата, так и при комбинации с плазмой реконвалесцентов). Обращают на себя внимание результаты, полученные в работе [36], в которой на достаточно представительной группе испытуемых выявлено, что различия с группой сравнения статистически достоверны с уровнем надёжности $p=0,027$.

В то же время следует указать, что сама возможность эффективного лечения напрямую связана с величиной порогового цикла заболевания, (англ. Cycle threshold (СТ)), определяемого для каждого индивидуального больного. Величина СТ для здорового человека не менее 40, критической величиной СТ для заболевших лихорадкой Эбола является величина СТ менее 20 [37, 38]. При лечении больных показано, что величина временного интервала между введением первой дозы интерферона- β -1a и первым отрицательным результатом ОТ-ПЦР находится в обратной зависимости от величины СТ (r = минус 0,9) [39]. При лечении фавипиравиром больных, характеризующихся величиной СТ более 30 показатель летальности среди заболевших снизился до 20% (по сравнению с 30% в группе без лечения), в то время как в группе больных с величиной СТ менее 20 показатель летальности был даже несколько выше такового в контрольной группе (91 и 85%, соответственно) [6].

Особенности взаимодействия вируса Эбола с клетками макроорганизма указывают на то, что препараты, ингибирующие активность вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (белок L), в целом, являются более эффективными по сравнению

с препаратами, препятствующими входу вируса в клетки. В качестве химиопрепаратов, ингибирующих активность белка L, в настоящее время рассматриваются, главным образом, химические соединения, относящиеся к классу аномальных нуклеозидов. Помимо рассмотренных выше фавипиравира и бринцидофовира, специалистами была изучена эффективность GS-5734 — монофосфат нуклеозидного аналога аденозина [40].

В первом эксперименте животным, инфицированным вирусом Эбола, вводили препарат GS-5734 в дозе 3 мг/кг либо спустя 30–90 мин (группа Д0), либо спустя двое суток после заражения (группа Д2). Выживаемость составила 33% в группе Д0 и 67% в группе Д2. Гибель животных в обеих группах свидетельствует о том, что доза препарата GS-5734 3 мг/кг была ниже оптимального значения [40].

Во втором эксперименте препарат GS-5734 вводили по схемам: 10 мг/кг, затем 3 мг/кг ежедневно, первое введение препарата через 2 сут. после инфицирования; 10 мг/кг, затем 3 мг/кг ежедневно, первое введение препарата через 3 сут. после инфицирования; 10 мг/кг, ежедневно, первое введение препарата через 3 сут. после инфицирования.

Все животные, которые получали этот препарат через 3 сут. после инфицирования, выжили. Однако противовирусный эффект, выявляемый по снижению концентрации вирусной РНК в крови с помощью ОТ-ПЦР, был более выражен в третьей группе (10 мг/кг, ежедневно, первое введение препарата через 3 сут. после инфицирования) [40]. В литературе имеются сведения об его использовании для лечения 2 больных лихорадкой Эбола, которые выздоровели [21].

Результаты клинических испытаний фавипиравира, бринцидофовира и GS-5734 представлены в табл. 4. Клинические испытания (фазы II и

Таблица 4. Результаты клинических испытаний химиотерапевтических средств лечения заболевания, вызываемого вирусом Эбола

Название (синонимы)	Фирма-производитель	Описание	Способ применения	Сведения о клинических испытаниях
Фавипиравир (Т-705)	Toyama Chemical, Fujifilm group (Токио, Япония)	6-фтор-3-гидрокси-2-пиазинкарбоксамид. Ингибитор РНК полимеразы (белок L)	Энтеральный (<i>per os</i>)	Фаза II клинических испытаний начата в декабре 2014 г. в Гвинее. Эффективность подтверждена снижением уровня летальности. Фаза II клинических испытаний начата в апреле 2016 г. в Гвинее, испытания проведены на выздоровевших после болезни мужчинах, в сперме которых содержался вирус Эбола [38]
Бринцидофовир (СМХ001)	Chimerix (Дарем, США)	3-гексадецилокси-1-пропанола липидный конъюгат ациклического нуклеозида фосфаната цидофовира. Механизм противовирусной активности в отношении вируса Эбола неизвестен [16]	Энтеральный (<i>per os</i>)	Фаза II клинических испытаний началась в октябре 2014 г. Подтверждена безопасность и толерантность препарата [35]
GS-5734	Gilead (Фостер Сити, США)	Монофосфорамидат аналог аденозина. Ингибитор вирусной РНК-полимеразы (L) [40]	Внутривенный	Фаза II клинических испытаний началась в июне 2016 г. в Либерии. Антивирусная активность, клиренс вируса Эбола безопасность для выздоровевших после заболевания мужчин, в сперме которых выявлен вирус Эбола

III) были начаты лишь в конце эпидемической вспышки заболевания, вызванного вирусом Эбола в период 2014–2016 гг. [42], поэтому исследования эффективности ряда противовирусных препаратов не имеют достаточной доказательной базы [9]. Так, клинические испытания бринцидофова в Либерии в 2015 г. были прекращены ввиду отсутствия новых случаев заболевания.

По совокупности всех имеющихся к настоящему времени данных наиболее перспективным неспецифическим противовирусным препаратом в отношении заболевания, вызванного вирусом Эбола, является фавипиравир.

Как следует из данных, представленных в табл. 4, представленные НМСЗ могут быть рекомендованы для лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола. Их эффективность сопоставима с таковой для таких рекомендованных специфических средств защиты, как плазма реконвалесцентов [43], моноклональные антитела (ZMapp) [42], малые интерферирующие РНК [44]. С учётом большей доступности и меньшей стоимости НМСЗ по сравнению

с любым из перечисленных видов специфических средств защиты это имеет несомненное значение для предотвращения распространения заболевания при возникновении эпидемических вспышек.

Таким образом, общей тенденцией создания НМСЗ в отношении заболевания, вызванного вирусом Эбола, является не разработка новых препаратов, а попытки выявления противовирусной активности уже известных препаратов, ранее имевших иное целевое назначение.

В качестве наиболее эффективного НМСЗ в отношении заболевания, вызванного вирусом Эбола, в настоящее время следует рассматривать фавипиравир. Однако эффективность его применения во многом определяется тяжестью заболевания (величиной СТ).

Наиболее целесообразным путём применения НМСЗ (в частности, фавипиравира) является профилактический приём перед и во время посещения регионов, эндемичных по вирусу Эбола, перед контактами с заболевшими людьми, побывавшими в эндемичных регионах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smither S.J., Eastaugh L.S., Steward J.A., Nelson M., Lenk R.P., Lever M.S. Post-exposure efficacy of oral T-705 (Favipiravir) against inhalational Ebola virus infection in a mouse model. *Antiviral Res* 2014; 104: 153–155.
2. Борисевич И.В., Потрываева Н.В., Мельников С.А. и др. Получение иммуноглобулина к вирусу Марбург на основе сыворотки крови лошадей. *Вопросы вирусологии*. — 2008. — № 53 (1). — С. 39–41. / Borisevich I.V., Potryvaeva N.V., Mel'nikov S.A. i dr. Poluchenie immunoglobulina k virusu Marburg na osnove syvorotki krovi loshadej. *Voprosy virusologii* 2008; 53 (1): 39–41. [in Russian].
3. Борисевич И.В., Михайлов В.В., Хамитов Р.А. и др. Использование обезьян для доклинической оценки специфических средств профилактики и лечения геморрагических лихорадок Эбола и Ласса. Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях. Материалы Российской конференции. 2000. — 210 с. / Borisevich I.V., Mikhailov V.V., Khamitov R.A. i dr. Ispol'zovanie obez'yan dlya doklinicheskoy otsenki spetsificheskikh sredstv profilaktiki i lecheniya gemorragicheskikh likhoradok Ebola i Lassa. V knige: *Organizm i okruzhayushchaya sreda: zhizneobespechenie i zashchita cheloveka v ekstremal'nykh usloviyakh* Materialy Rossijskoj konferentsii. 2000; 210 [in Russian].
4. Jacobs M., Aarons E., Bhagani S., Buchanan R., Cropley I., Hopkins S. et al. Post-exposure prophylaxis against Ebola virus disease with experimental antiviral agents: a case-series of health-care workers. *Lancet Infect Dis* 2015; 15 (11): 1300–1304.
5. Oestereich L., Ludtke A., Wurr S., Rieger T., Munoz-Fontela C., Gunther S. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res* 2014; 105: 17–21.
6. Sissoko D., Laouenan C., Folkesson E., M'Lebing A.B., Beavogui A.H., Baize S. et al. Experimental treatment with favipiravir for Ebola virus disease (the JIKI Trial): a historically controlled, single-arm proof-of-concept trial in Guinea. *PLoS Med* 2016; 13 (3): 1–36.
7. Florescu D.F., Keck M.A. Development of CMX001 (Brincidofovir) for the treatment of serious diseases or conditions caused by dsDNA viruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12 (10): 1171–1178.
8. Warren T.K., Wells J., Panchal R.G., Stuthman K.S., Garza N.L., Van Tongeren S.A. et al. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature* 2014; 508 (7496): 402–405.
9. Wu W., Liu S. Research progress of prevention and treatment of Ebola virus infection. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2014; 34 (10): 1519–1522.
10. Kesel A.J., Huang Z., Murray M.G., Prichard M.N., Caboni L., Nevin D.K., et al. Retinazone inhibits certain blood-borne human viruses including Ebola virus Zaire. *Antivir Chem. Chemother* 2014; 23 (5): 197–215.
11. Alfson K.J., Worwa G., Carrion R., Griffiths A. Determination of the Spontaneous Mutation Frequency of Ebola virus and Exploitation of this Therapeutically. *J Virol* 2015; 02701–15.
12. Kouznetsova J., Sun W., Martínez-Romero C., Tawa G., Shinn P., Chen C.Z. et al. Identification of 53 compounds that block Ebola virus-like particle entry via a repurposing screen of approved drugs. *Emerg Microbes Infect* 2014; 3 (12): e84.
13. Ilinykh P.A., Tigabu B., Ivanov A., Ammosova T., Obukhov Y., Garron T. et al. Role of protein phosphatase 1 in dephosphorylation of Ebola virus VP30 protein and its targeting for the inhibition of viral transcription. *J Biol Chem* 2014; 289 (33): 22723–22738.
14. Cohen E. Doctor treats Ebola with HIV drug in Liberia-seemingly successfully. edition.cnn.com/2014/09/27/health/.
15. Smither S.J., Eastaugh L., Ngugi S., O'Brien L., Phelps A., Steward J. et al. Ebola Virus Makona Shows Reduced Lethality in an Immune-deficient Mouse Model. *J Infect Dis* 2016; 214 (3): 268–274.
16. Rhein B.A., Powers L.S., Rogers K., Anantpadma M., Singh B.K., Sakurai Y. et al. Interferon-γ Inhibits Ebola Virus Infection. *PLoS Pathog* 2015; 11 (11): 1–28.
17. Smith L.M., Hensley L.E., Geisbert T.W., Johnson J., Stossel A., Honko A. et al. Interferon-β therapy prolongs survival in rhesus macaque models of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *Infect Dis* 2013; 208 (2): 310–318.
18. Jahrling P.B., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Swearingen J.R., Bray M., Jaax N.K. et al. Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infection. *Infect Dis* 1999; 179 (1): 224–234.
19. Johansen L.M., Brannan J.M., Delos S.E., Shoemaker C.J., Stossel A., Lear C. et al. FDA-Approved Selective Estrogen Receptor Modulators inhibit Ebola virus infection. *Sci Transl Med* 2013; 5 (190): 1–13.
20. Gignoux E., Azman A.S., de Smet M., Azuma P., Massaquoi M., Job D. et al. Effect of Artesunate-Amodiaquine on Mortality Related to Ebola Virus Disease. *N Engl J Med* 2016; 374 (1): 23–32.
21. Madrid P.B., Panchal R.G., Warren T.K., Shurtleff A.C., Endsley A.N., Green C.E. et al. Evaluation of Ebola virus inhibitors for drug Repurposing. *ACS Infect Dis* 2015; 1 (7): 317–326.
22. Gehring G., Rohrmann K., Atenchong N., Mittler E., Becker S., Dahlmann F. et al. The clinically approved drugs amiodarone, dronedarone and

- verapamil inhibit filovirus cell entry. *Antimicrob Chemother* 2014; 69 (8): 2123–2131.
23. Dowall S.D., Bosworth A., Watson R., Bewley K., Taylor I., Rayner E. *et al.* Chloroquine inhibited Ebola virus replication *in vitro* but failed to protect against infection and disease in the *in vivo* guinea pig model. *Gen Virol* 2015; 96 (12): 3484–3492.
 24. Falzarano D., Safronetz D., Prescott J., Marzi A., Feldmann F., Feldmann H. Lack of protection against ebola virus from chloroquine in mice and hamsters. *Emerg Infect Dis* 2015; 21 (6): 1065–1067.
 25. Dunning J., Kennedy S.B., Antierens A., Whitehead J., Ciglenecki I., Carson G. *et al.* Experimental treatment of Ebola virus disease with brincidofovir. *PLoS One* 2016; 11 (9): 1–9.
 26. Florescu D.F., Kalil A.C., Hewlett A.L., Schuh A.J., Stroher U., Uyeki T.M. *et al.* Administration of Brincidofovir and Convalescent Plasma in a Patient With Ebola Virus Disease. *Clin Infect Dis* 2015; 61 (6): 969–973.
 27. McMullan L.K., Flint M., Dyal J., Albarino C., Olinger G.G., Foster S. *et al.* The lipid moiety of brincidofovir is required for *in vitro* antiviral activity against Ebola virus. *Antiviral Res* 2016; 125: 71–78.
 28. Lo M.K., Jordan R., Arvey A., Sudhamsu J., Shrivastava-Ranjan P., Hotard A.L. *et al.* GS-5734 and its parent nucleoside analog inhibit Filo-, Pnuemo-, and Paramyxoviruses. *Sci Rep* 2017; 7: 1–7.
 29. Warren T.K., Jordan R., Lo M.K., Ray A.S., Mackman R.L., Soloveva V. *et al.* Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature* 2016; 531 (7594): 381–385.
 30. Madrid P.B., Chopra S., Manger I.D., Gilfillan L., Keepers T.R., Shurtleff A.C. *et al.* A systematic screen of FDA-approved drugs for inhibitors of biological threat agents. *PLoS One* 2013; 8 (4): 1–14.
 31. Sweiti H., Ekwunife O., Jaschinski T., Lhachimi S.K. Repurposed therapeutic Agents Targeting the Ebola virus: A systematic Review. *Curr Ther Res Clin Exp* 2017; 84: 10–21.
 32. McCarthy S.D., Majchrzak-Kita B., Racine T., Kozłowski H.N., Baker D.P., Hoenen T. *et al.* A Rapid Screening Assay Identifies Monotherapy with Interferon- β and Combination Therapies with Nucleoside Analogs as Effective Inhibitors of Ebola Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10 (1): 1–16.
 33. Jarhling P.B., Geisbert J.B., Swearingen J.R., Larsen T., Geisbert T.W. Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in non-human primates. *Infect Dis* 2007; 196 (2): 400–403.
 34. Audet J., Kobinger G.P. Immune evasion in ebolavirus infections. *Viral Immunol* 2015; 28 (1): 10–18.
 35. Cong Y., Dyal J., Hart B.J., DeWald L.E., Johnson J.C., Postnikova E. *et al.* Evaluation of the Activity of Lamivudine and Zidovudine against Ebola Virus. *PLoS One* 2016; 11 (11): 1–19.
 36. Bai C.Q., Mu J.S., Kargbo D., Song Y.B., Niu W.K., Nie W.M. *et al.* Clinical and Virological Characteristics of Ebola Virus Disease Patients Treated With Favipiravir (T-705)-Sierra Leone, 2014. *Clin Infect Dis* 2016; 63 (10): 1288–1294.
 37. Liu X., Speranza E., Muñoz-Fontela C., Haldenby S., Rickett N.Y., Garcia-Dorival I. *et al.* Transcriptomic signatures differentiate survival from fatal outcomes in humans infected with Ebola virus. *Genome Biol* 2017; 18 (1): 1–17.
 38. Trad M.A., Naughton W., Yeung A., Mazlin L., O'sullivan M., Gilroy N. *et al.* Ebola virus disease: An update on current prevention and management strategies. *Clin Virol* 2017; 86: 5–13.
 39. Konde M.K., Baker D.P., Traore F.A., Sow M.S., Camara A., Barry A.A. *et al.* Interferon β -1a for the treatment of Ebola virus disease: A historically controlled, single-arm proof-of-concept trial. *PLoS One* 2017; 12 (2): 1–13.
 40. WHO URL: <http://apps.who.int/gho/data/node.ebola-sitrep>.
 41. Borobia A.M., Mora-Rillo M., Ramqírez Olivencia G., Lago M., Arsuaga M., De la Calle F. *et al.* High dose favipiravir: first experience in a patient with Ebola. *Clin Ther* 2015; 37 (8): 15–16.
 42. Qiu X., Wong G., Audet J., Bello A., Fernando L., Alimonti J.B. *et al.* Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 2014; 514: 47–53.
 43. Van Griensven J., Edwards T., de Lamballerie X., Semple M.G., Gallian P., Baize S. *et al.* Evaluation of convalescent plasma for Ebola virus disease in Guinea. *New Engl Med* 2016; 374: 33–42.
 44. Dunning J., Sahr F., Rojek A., Gannon F., Carson G., Idriss B. *et al.* Experimental treatment of Ebola virus disease with TKM-130803: a single-arm phase 2 clinical trial. *PLoS Med* 2016; 13 (4): 1–19.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сизикова Татьяна Евгеньевна — к. б. н., научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Лебедев Виталий Николаевич — д. б. н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Петров Александр Анатольевич — к. м. н., начальник отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, член-корр. РАН, начальник института ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Памяти Г. В. Долговой

In Memory of G. V. Dolgova

9 сентября 2019 года на 76-м году жизни скончалась Галина Владимировна Долгова.

Все те, кто её знали, работали с ней, дружили, общались на научном поприще, слушали её выступления, всегда яркие и не оставлявшие равнодушными слушателей — все они вспоминают Долгову Г. В. взволнованными добрыми словами.

Галина Владимировна окончила Московский государственный университет, кафедру физиологии человека и животных Биологического факультета. Это были удивительные годы, на кафедре между студентами и преподавателями всегда царило взаимопонимание и уважение, а проведение практических занятий не могло не привить любовь к научной деятельности. После окончания МГУ Галина Владимировна была уже состоявшимся научным работником.

Её трудовой путь начался сразу после школы и длился до последнего дня жизни, причём большая его часть связана с ВНИИ антибиотиков, преобразованном в Государственный научный центр по антибиотикам, где, работая в лаборатории фармакологии, она изучала фармакологические свойства антибиотиков, их переносимость и безвредность. За этот период она выросла в должности от младшего научного сотрудника до руководителя отдела.

Научные статьи, доклады, обучающие семинары, разработанная ОФС «Бактериальные эндотоксины» для ГФ РФ — это всего лишь малая то-



лика её научных интересов. Более 500 исследований по изучению лекарственных веществ проведено под руководством Галины Владимировны. Благодаря её интересным и смелым идеям выполнялись доклинические исследования, а также разработка норм биологических показателей качества для нормативных документов.

С именем Галины Владимировны связано внедрение и развитие метода определения бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста.

Галина Владимировна незримо присутствует среди нас, напоминая о себе при самых разных обстоятельствах. Вспомним насыщенное особым эмоциональным светом её общение с многочисленными учениками, её улыбку, доброту, непередаваемые шутки, жесты, диалоги с собеседниками — проявления симпатии и расположения. Вспомним неизменное её внимание к просьбам помочь — советом, консультацией, идеями, опытом. Такова была суть этого Человека, богато одарённого природой способностью нести радость всем, с кем она соприкасалась.

Светлая память учёному, великому труженику и удивительному человеку.

Редколлегия, редакционный совет и редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия» выражают глубокое соболезнование родным и близким Галины Владимировны Долговой и вместе с ними скорбят о её безвременной кончине.

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 Э.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 «Полилинника», 2015, №3.