

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 62



3-4'2017

Научно-практический журнал

Входит в перечень **ЖНВЛП**



ИНГАРОН®

ИНТЕРФЕРОН ГАММА

3

НОВЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

- папилломовирусная инфекция
- генитальный герпес
- опоясывающий герпес

**ИМУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ,
ПРОТИВОВИРУСНАЯ,
ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ
АКТИВНОСТЬ**



интерферон гамма человеческий рекомбинантный,
лиофилизат для приготовления раствора
для внутримышечного и подкожного введения

5 флаконов

100000 ME

www.ingaron.ru

Регистрационное удостоверение № ЛС-001330 от 27.08.2010

РЕКЛАМА

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ПРОКОНСУЛЬТИРУЙТЕСЬ СО СПЕЦИАЛИСТОМ

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»

Issued 12 times a year
Since 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: journalgnca@yandex.ru

Зав. редакцией Л. Б. Смирнова

Корректор: А. Н. Лобусева

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: gncajournal@yandex.ru

А. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2016

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 2017

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 62

3—4'2017

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.

Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Член-корр РАМН, проф., д. м. н. Белоусов Ю. Б.

Проф., д. м. н. Белобородов В. А.

Проф. Говорун В. М.

Проф. Гомберг М. А.

Д. б. н. Даниленко В. Н.

Проф. Климко Н. Н.

Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.

Проф., д. м. н. Никитин А. В.

Проф., д. б. н. Полин А. Н.

Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.

Проф. Руднов В. А.

Проф. Тишков В. Н.

Проф., д. б. н. Фирсов А. А.

Проф., д. м. н. Яковлев С. В.

Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.

к.б.н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.

Бибикова М. В.

Васильев А. Н.

Волжанин В. М.

Дмитриева Н. В.

Долгова Г. В.

Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.

Ильина Е. Н.

Клясова Г. А.

Ленёва И. А.

Митрохин С. Д.

Романцов М. Г.

Сычев Д. А.

Тец В. В.

Цыбанев А. А.

Ших Е. В.

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

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

Оригинальные статьи

Гулий О. И., Зайцев Б. Д., Шихабудинов А. М.,
Бородин И. А., Ларионова О. С., Жничкова Е. Г.
Определение чувствительности микробных клеток
к полимиксину методом электроакустического анализа
Быков Е. Е., Мирчинк Е. П., Исакова Е. Б.,
Бычкова Е. Н., Олсуфьева Е. Н., Тевяшова А. Н.
Изучение антибактериальной активности
и энергии связывания с пептидным лигандом
гибридных антибиотиков ванкомицин–азитромицин
и эремомин–азитромицин
Никольская Е. Д., Жунина О. А., Сокол М. Б.,
Фомичева М. В., Гукасова Н. В., Воронцов Е. А.,
Яббаров Н. Г., Терещенко О. Г., Северин Е. С.
Антибактериальная активность полимерной формы
джозамицина
Пьянова Л. Г., Долгих В. Т., Лихолобов В. А., Рудаков Н. В.,
Чеснокова М. Г., Седанова А. В.
Антибактериальные и антимикотические свойства
гранулированных углеродных сорбентов,
модифицированных олигомерами молочной кислоты
Боровская Т. Г., Машанова В. А.
Экспериментальная оценка влияния препарата Кагоцел
на репродуктивную функцию при его введении
профилактическими курсами в течение периода
неполовозрелости

В помощь практикующему врачу

Сереброва С. Ю., Прокофьев А. Б., Журавлева М. В.,
Казаков Р. Е., Сичинава И. В., Городецкая Г. И.,
Еременко Н. Н., Лазарева Н. Б., Галстян Л. Р.,
Смолярчук Е. А., Кургузова Д. О., Барков А. О.
Фармакогенетика и воспалительные заболевания
кишечника у взрослых и детей: перспективы
диагностики и лечения
Хрянин А. А., Решетников О. В.
Иммунологические нарушения при урогенитальной
хламидийной инфекции и методы их коррекции

Обзоры

Кузнецова Ю. К., Сергеев В. П., Кузнецова К. Ю. кызы
Исторические аспекты лечения кожного лейшманиоза

По страницам журналов

Некролог

Памяти А. Н. Полина

Original Papers

- 3 Guliy O. I., Zaytsev B. D., Shikhabudinov A. M.,
Borodina I. A., Larionova O. S., Zhnichkova E. G.
Determination of Microbial Sensitivity to Polymyxin by the
Method of Electroacoustic Analysis
- 10 Bykov E. E., Mirchink E. P., Isakova E. B.,
Bychkova E. N., Olsufyeva E. N., Tevyashova A. N.
Study of Antibacterial Activity and Energy
of Formation of Peptide Ligand Complexes
With Hybrid Antibiotics Vancomycin–Azithromycin
and Eremomycin–Azithromycin
- 18 Nikolskaya E. D., Zhunina O. A., Sokol M. B.,
Fomicheva M. V., Gukasova N. V., Vorontsov E. A.,
Yabbarov N. G., Tereshchenko O. G., Severin E. S.
Antibacterial Activity of the Polymeric Form
of Josamycin
- 25 P'yanova L. G., Dolgikh V. T., Likholobov V. A.,
Rudakov N. V., Chesnokova M. G., Sedanova A. V.
Antibacterial and Antimycotic Properties
of Granular Carbon Sorbents Modified
With Lactic Acid Oligomers
- 31 Borovskaya T. G., Mashanova V. A.
Experimental Evaluation of the Effect
of Kagocel on Reproductive Function
When Administered in Prophylactic Courses During
the Period of Impuberty

Guidelines for Practitioners

- 37 Serebrova S. Yu., Prokofiev A. B., Zhuravleva M. V.,
Kazakov R. E., Suchinava I. V., Gorodetskaya G. I.,
Eremenko N. N., Lazareva N. B., Galstyan L. R.,
Smolyarchuk E. A., Kurguzova D. O., Barkov A. O.
Pharmacogenetics and Inflammatory
Bowel Diseases in Adults and Children:
Diagnosis and Treatment Prospects
- 46 Khryanin A. A., Reshetnikov O. V.
Immunological Disorders in the Course of a Urogenital
Chlamydial Infection and Methods of Their Correction

Reviews

- 53 Kuznetsova Yu. K., Sergeev V. P., Kuznetsova K. Yu. Qizi
Historical Aspects of the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis

Abstracts

Obituary

- 67 In Memory A. N. Polin

* 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.

Определение чувствительности микробных клеток к полимиксину методом электроакустического анализа

О. И. ГУЛИЙ^{1,2,3}, Б. Д. ЗАЙЦЕВ⁴, А. М. ШИХАБУДИНОВ⁴,
И. А. БОРОДИНА⁴, О. С. ЛАРИОНОВА², Е. Г. ЖНИЧКОВА²

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

² Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

³ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт, Саратов

⁴ Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Саратов

Determination of Microbial Sensitivity to Polymyxin by the Method of Electroacoustic Analysis

O. I. GULIY^{1,2,3}, B. D. ZAITSEV⁴, A. M. SHIKHABUDINOV⁴,
I. A. BORODINA⁴, O. S. LARIONOVA², E. G. ZHNICHKOVA²

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov

² Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov

³ Saratov Scientific Research Veterinary Institute, Saratov

⁴ Saratov Branch of the Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS, Saratov

Впервые исследовано влияние полимиксина на изменение электрофизических (ЭФ) параметров суспензии клеток *Escherichia coli* штамма К-12 методом электроакустического анализа. Показано, что максимальные изменения регистрируемого сигнала происходят при концентрации полимиксина 25 мкг/мл, при этом они не зависели от времени воздействия антибиотика. Данные, полученные методом акустического анализа, подтверждены стандартным микробиологическим способом определения чувствительности микроорганизмов к полимиксину. Показана возможность регистрации чувствительности микробных клеток к антибактериальным препаратам и определения их антибактериальной активности на примере полимиксина методом электроакустического анализа клеточных суспензий.

Ключевые слова: полимиксин, *Escherichia coli*, микробные клетки, чувствительность, акустический биологический датчик.

The influence of polymyxin on the change in the electrophysical parameters of a suspension of *Escherichia coli* cells of the K-12 strain was studied for the first time by electroacoustic analysis. It was shown that the maximum changes in the detected signal occur at a concentration of polymyxin of 25 µg/ml, furthermore they did not depend on the time of exposure to the antibiotic. The data obtained by the acoustic analysis method was confirmed by the standard microbiological method for determining microorganisms' sensitivity to polymyxin. The article shows the possibility of recording the sensitivity of microbial cells to antibacterial drugs and determining their antibacterial activity by the example of polymyxin with the use of the method of electroacoustic analysis of cell suspensions.

Keywords: polymyxin, *Escherichia coli*, microbial cells, sensitivity, acoustic biological sensor.

Введение

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам является одним из диагностических методов, широко применяемым в терапии инфекционных заболеваний. Чувствительными к антибиотикам считаются те микроорганизмы, на которые испытуемый антибиотик оказывает бактериостатическое или бактерицидное действие. Мерой чувствительности микроорганизмов к антибиотикам является минимальная концентрация препарата, подавляющая рост микроорганиз-

ма при стандартных условиях опыта. В настоящее время для определения чувствительности микробов к антибиотикам используют стандартные методы диффузии в гель агар-агара с применением дисков, методы серийных разведений, а также модификации этих стандартных методик [1–2]. Кроме того, созданы автоматизированные системы для определения чувствительности бактерий к антибиотикам. В одних системах автоматизированы только операции разведения и инкубации, тогда как рост бактерий определяется традиционными методами. В других системах все начальные операции выполняются вручную и автоматизированы лишь этапы считывания и регистрации результатов. Некоторые системы автоматизации предусматривают создание программ для всех

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. E-mail: gulyi_olga@mail.ru

операций, используемых в определении чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам (приготовление образца и бактериального посевного материала, инкубация, считывание результатов и их регистрация) [3–6]. Поэтому развитие новых методов определения чувствительности микробных клеток к антибактериальным препаратам является весьма актуальным для микробиологии, медицины и ветеринарии.

Общие теории действия лекарственных веществ основываются на представлении о связывании веществ со специфическим рецептором (часто мембранным белком), вызывающим биохимический отклик [7]. В результате происходит ускорение или замедление определённой реакции обмена или изменение проницаемости мембран, что, в свою очередь, приводит к изменению электрофизических свойств микробных клеток, проводимости среды и её вязкости. В связи с этим методы электрофизического анализа, основанные на исследовании клеток как электрофизических объектов со сложной структурой, представляют собой новый подход к оценке прижизненных физиологических параметров клеток и их гетерогенности [8]. В этом плане весьма перспективным является применение метода электроакустического анализа, основанного на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрика. В отличие от традиционных резонаторов с продольным полем эти резонаторы более чувствительны к контактирующей жидкости, поскольку реагируют на изменение как механических, так и электрических её свойств [9–11]. Существует большое количество публикаций, посвящённых этим резонаторам и их использованию для решения ряда микробиологических и биотехнологических задач [10–15]. Описанные преимущества открывают перспективы использования метода акустического анализа для регистрации воздействия антибактериальных препаратов на микробные клетки и определения их антибиотикочувствительности.

Полимиксины — амфифильные (содержат и гидрофильные, и гидрофобные группы) катионные поверхностно-активные соединения. Взаимодействуя с фосфолипидами, полимиксины нарушают структуру бактериальных мембран и повышают их проницаемость. Повреждение структуры мембраны приводит к изменению её проницаемости как внутри, так и вне клеток [16]. Данные повреждения мембраны могут приводить к изменению электроакустических параметров суспензии клеток, регистрируемых акустическим датчиком.

Целью работы являлась оценка воздействия полимиксина на микробные клетки методом акустического анализа.

Материал и методы

В работе использовали микроорганизмы *Escherichia coli* штаммов K-12, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов).

Микроорганизмы хранили при +4°C на чашках Петри с твёрдой питательной средой LB, содержащей 3% агар-агара. Микробные клетки пересевали каждые 2 нед.

Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB [17] следующего состава (г/л): NaCl (Becton, Dickinson & Co., США) — 10,0; пептон (Becton, Dickinson & Co., США) — 5,0; дрожжевой экстракт (DIFCO, США) — 5,0. Полужидкая среда LB содержала 0,7% агар-агара; твёрдая — 1,5 и 3% агар-агара.

Культуры бактерий выращивали в 250 мл колбах Эрленмейера на жидкой среде LB. Инкубирование клеток проводили на круговой качалке при интенсивности перемешивания 160 об/мин при 30±1°C в течение 18–20 ч.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальному препарату (АБП) осуществляли с помощью метода серийных разведений в жидкой питательной среде. Питательный бульон для определения чувствительности разливали по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок определяли необходимым диапазоном разведений АБП и увеличивали на одну для постановки «отрицательного» контроля [1]. Рабочий раствор АБП готовили из основного раствора с использованием жидкой питательной среды. Концентрацию рабочего раствора рассчитывали исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду серийных разведений, учитывая фактор разбавления препарата при последующей инокуляции. В исследованиях концентрация антибиотика уменьшалась от 25 мкг/мл до 0,025 мкг/мл. Конечный объём среды в каждой пробирке составлял 1 мл. Контролем служила пробирка, содержащая чистую питательную среду («отрицательный» контроль хранили в холодильнике при 4°C до учёта результатов). Пробирки инкубировали 18 ч при 37°C. По истечению указанного срока результаты оценивали по изменению оптической плотности среды визуально.

Перед проведением электроакустического анализа микробные клетки отмывали трёхкратным центрифугированием при 2800×g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве дистиллированной воды (электропроводность 1,8 мС/см). Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при 110×g в течение 1 мин и использовали суспензию, оставшуюся в надосадочной жидкости. Затем доводили оптическую плотность подготовленной суспензии D670 для каждого вида используемых микроорганизмов до 0,4–0,42.

Все эксперименты по изучению изменений механических и электрических свойств суспензий микробных клеток при воздействии полимиксина проводили с помощью специально изготовленного датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем в диапазоне частот 6–7 МГц. Этот резонатор был изготовлен из пластины ниобата лития X-среза толщиной 0,5 мм. На нижней стороне пластины были нанесены два прямоугольных электрода с размерами 5×10 мм² с зазором между ними 3 мм. Область вокруг электродов и часть электродов были покрыты специальным лаком, который демпфировал паразитные волны Лэмба [9] и обеспечивал достаточно высокую добротность ~630. На верхней стороне пластины была приклеена жидкостная ячейка объёмом ~1 мл. На рис. 1 представлена схема используемого биосенсора, содержащего резонатор с двумя прямоугольными электродами на пластине ниобата лития X-среза и жидкостной контейнер. Присутствие контейнера объёмом 1 мл никак не меняло характеристики резонатора, поскольку его поперечные размеры были существенно больше, чем область электродов.

Для проведения электроакустического анализа подготовленные суспензии микробных клеток вносили в вышеупомя-

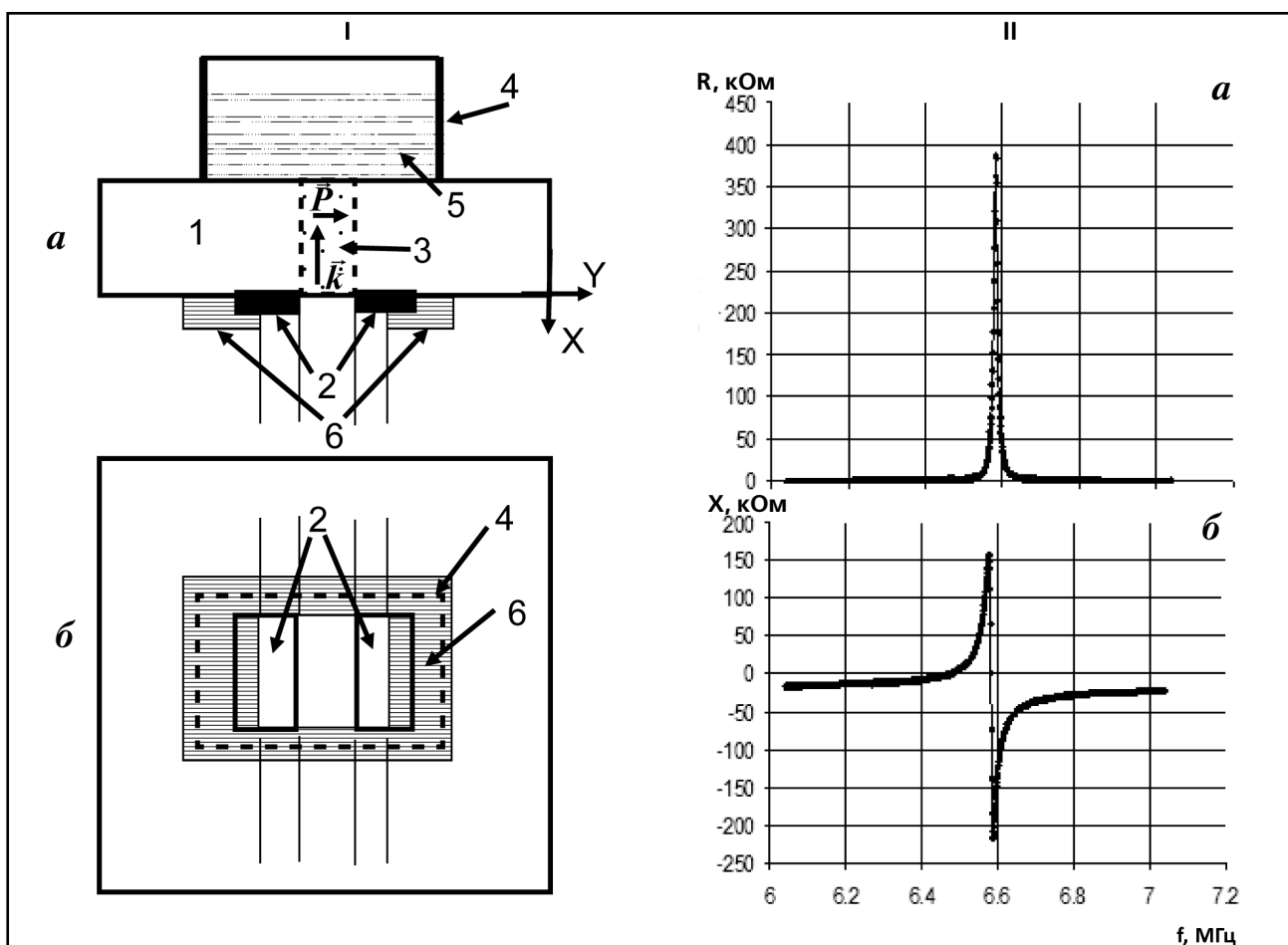


Рис. 1. (I) Биологический датчик.

Вид сбоку (а) и сверху (б) на биологический датчик: 1 — пьезоэлектрическая пластина; 2 — электроды; 3 — акустический луч; 4 — контейнер для суспензии; 5 — суспензия; 6 — слой поглощающего лака; k и P — направления волнового вектора и электрической поляризации, соответственно; X и Y — кристаллографические оси пластины.

(II) Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса ненагруженного резонатора.

нутую жидкостную ячейку и проводили измерения частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса датчика с помощью прецизионного измерителя LCR параметров Agilent 4285A, затем вносили исследуемый антибиотик и измерения повторялись.

Каждый эксперимент проводился не менее чем пять раз. Относительная погрешность результатов измерений исследуемых образцов составляла $\pm 2\%$.

Результаты исследования

Полимиксины, впервые исследованные в 1947 г., представляют собой близкие по строению антибиотики, вырабатываемые некоторыми штаммами аэробной спорообразующей палочки *Bacillus polymyxa*, обнаруженной в почве. Существует несколько разновидностей полимиксина. Например, колистин (полимиксин Е) продуцируется *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*) — микроорганизмом, который был выделен из пробы почвы, взятой в префектуре Фукусима (Япония). В клинической практике используются по-

лимиксин В (смесь полимиксинов В1 и В2) и колистин (полимиксин Е), структурные формулы которых представлены на рис. 2. Препарат оказывает бактерицидное действие, связанное с нарушением целостности мембраны микробной клетки. Антибактериальная активность полимиксинов распространяется только на грамотрицательную микрофлору: *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter* spp. [17]. Во многих случаях полимиксины остаются высокоактивными антибиотиками в отношении бактерий, устойчивых к большинству противомикробных препаратов [18]. Меньшая активность проявляется против анаэробов. Нечувствительны к действию полимиксинов все виды *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, грам (+) бактерии и многие анаэробы, в частности *Bacteroides fragilis*. Приобретённая бактериальная резистентность развива-

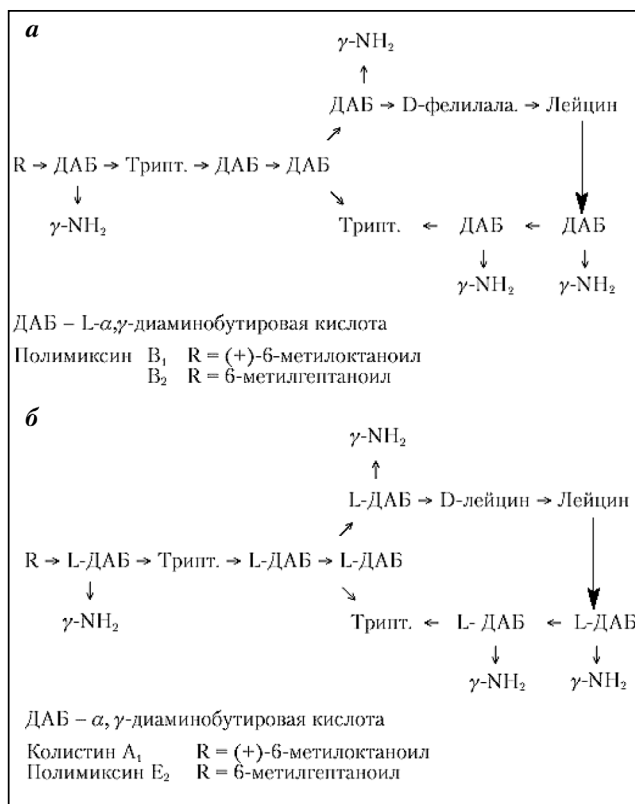


Рис. 2. Структурные формулы (а) полимиксина В и (б) полимиксина Е.

ется медленно и обычно связана со снижением проницаемости мембран для полимиксинов.

Поскольку полимиксин является антибиотиком широкого спектра действия и активен в отношении большого числа грамотрицательных палочек, в качестве объекта исследования использовали микробные клетки *E.coli* штамма К-12.

Биологическая активность полимиксина связана с воздействием на цитоплазматическую мембрану бактериальной клетки при взаимодействии с фосфолипидами. Полимиксины связываются с анионными участками мембраны и по характеру действия напоминают катионные детергенты. Повреждение структуры мембраны приводит к изменению её проницаемости как для внутри-, так и вне-клеточных компонентов [16]. Для оценки воздействия полимиксина на микробные клетки использовался резонатор с поперечным возбуждающим электрическим полем, в котором электроды с простейшей геометрией были нанесены на пластину из ниобата лития Х-среза. На область вокруг электродов было нанесено покрытие, поглощающее нежелательные колебания [9].

Согласно предварительным экспериментам по оптимизации условий проведения электроакустического анализа (выбор частоты измерения, времени взаимодействия, количества микробных клеток в измерительной ячейке) был выбран диапазон частот 6–7 МГц, при этом время эксперимента составляло ~10 мин. В измерительную ячейку

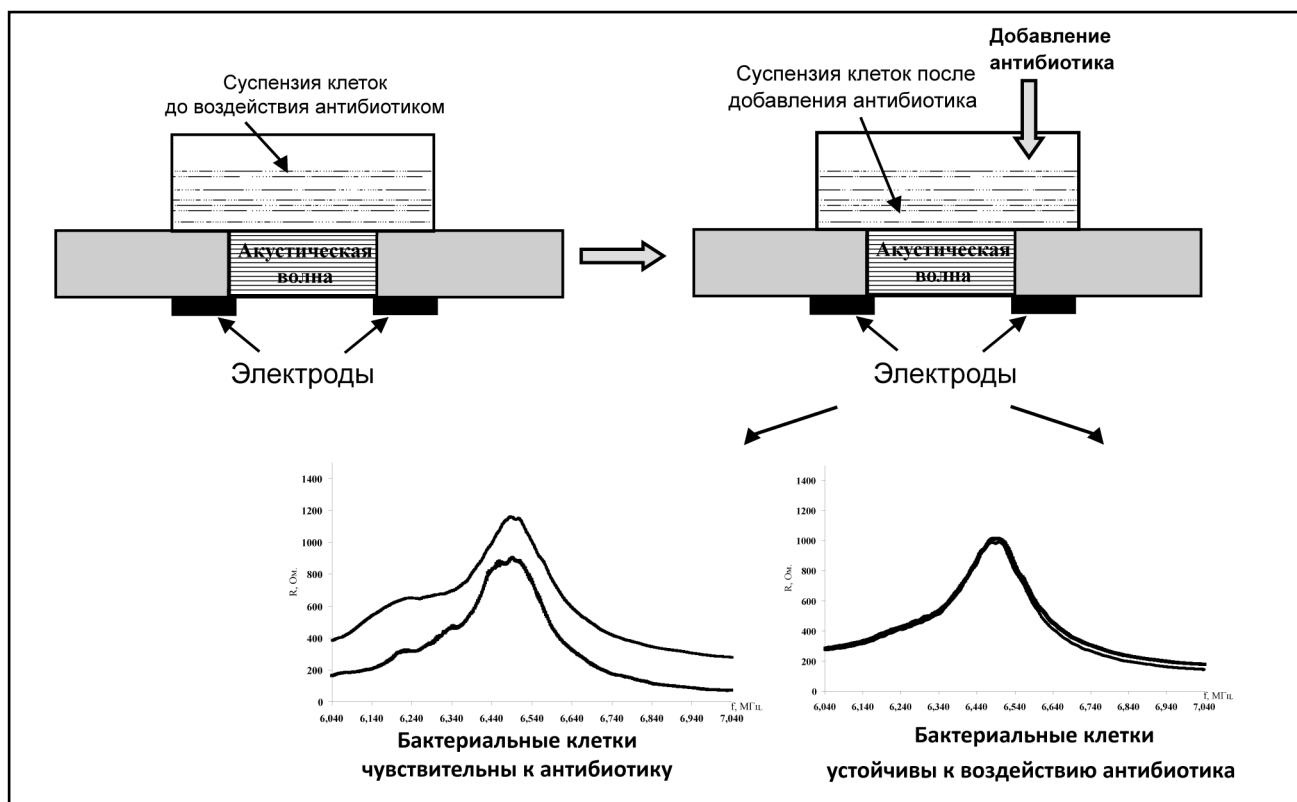


Рис. 3. Общая схема проведения электроакустического анализа.

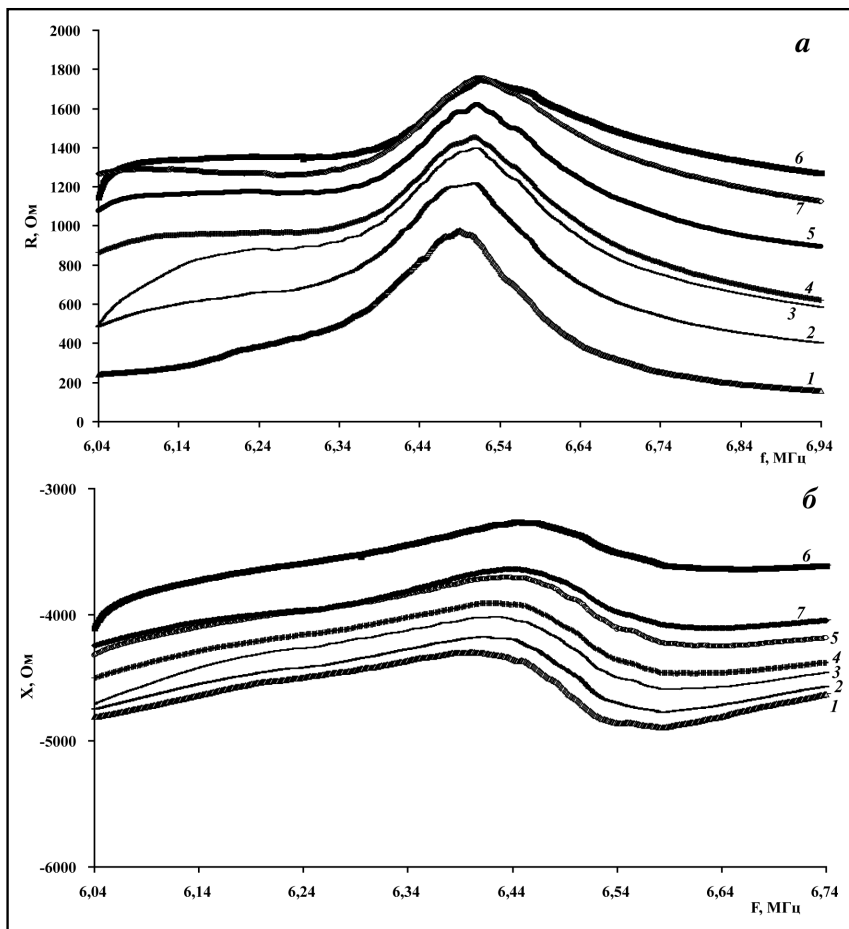


Рис. 4. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса при воздействии на микробные клетки *E.coli* XL-1 полимиксина.

1 — контроль — суспензия клеток без добавления антибиотика; 2, 3, 4, 5, 6 и 7 — суспензия клеток с добавлением разных концентраций антибиотика 1, 3, 6, 12, 25, 30 мкг/мл, соответственно.

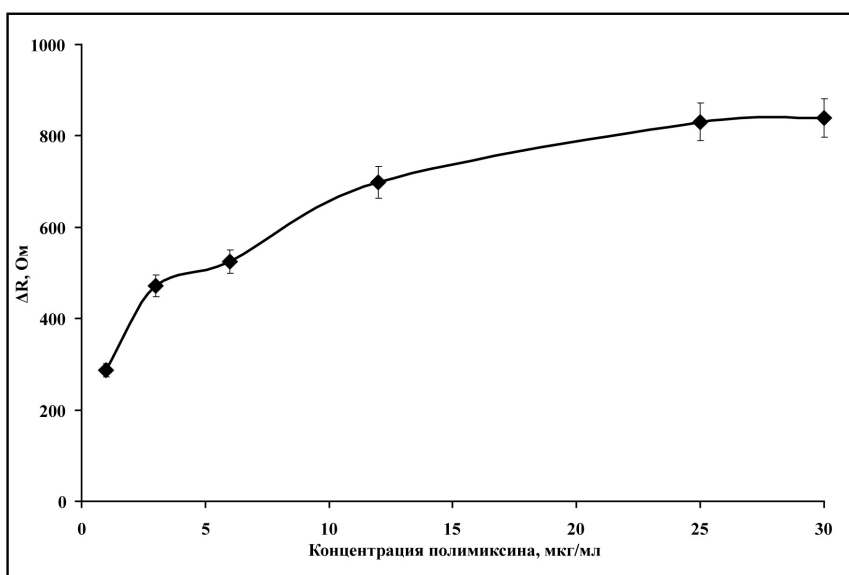


Рис. 5. Зависимость изменения максимальной величины реальной части электрического импеданса от концентрации полимиксина.

ку вносили микробные клетки в количестве 10^8 клеток/мл.

Первоначально нами исследовались изменения электроакустических параметров клеточной суспензии штамма К-12 при инкубации с разными концентрациями полимиксина. Для этого в измерительную ячейку вносили подготовленную суспензию клеток и измеряли частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса. Затем в суспензию клеток добавляли полимиксин с заданной концентрацией и измерения повторялись. Общая схема проведения экспериментов представлена на рис. 3. На рис. 4 представлены реальные (а) и мнимые (б) части электрического импеданса датчика, когда в жидкостной ячейке находилась суспензия бактериальных клеток *E.coli* штамма К-12 с добавлением разного количества полимиксина (1, 3, 6, 12, 25, 30 мкг/мл). Из представленных данных видно, что изменение электрического импеданса происходит уже при количестве полимиксина в образце из расчёта 1 мкг/мл. Для удобства представления экспериментальных данных на рис. 5 приведена зависимость изменения реальной части импеданса на резонансной частоте от концентрации полимиксина.

Как видно из полученных данных, с увеличением удельного количества вносимого антибиотика в клеточную суспензию изменение реальной части импеданса во всем диапазоне увеличивается вплоть до количества антибиотика 25 мкг/мл, и затем наступает насыщение. Поскольку при экспозиции клеток с полимиксином происходит повреждение структуры мембраны, что приводит к изменению её проницаемости как для внутри-клеточных, так и вне-клеточных компонентов, увеличение аналитического сигнала после инкубации клеток с антибиотиком может быть объяснено по-

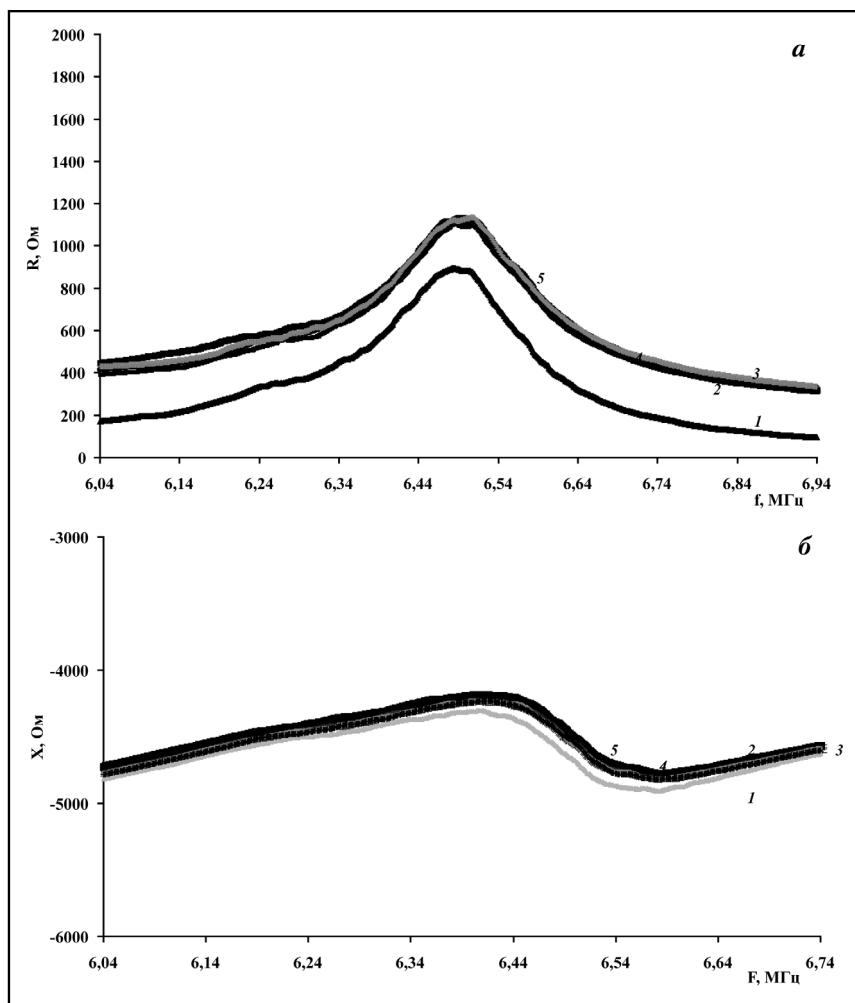


Рис. 6. Частотные зависимости реальной (а) и мнимой (б) частей электрического импеданса при воздействии на микробные клетки *E.coli* XL-1 полимиксина в течение различного временного интервала.

1 — суспензия клеток без добавления антибиотика; 2, 3, 4 и 5 суспензия клеток после инкубации с антибиотиком в течение 1, 10, 20 и 30 мин, соответственно).

вреждением мембраны клеток, выходом из клетки макромолекул цитоплазмы и изменением проводимости суспензии. В целом, полученные данные свидетельствуют о чувствительности микробных клеток к действию полимиксина.

На следующем этапе нами изучалась динамика изменений акустических параметров клеток *E.coli* K-12 при инкубации с полимиксином. Поскольку, при использовании антибиотика с концентрацией 3 мкг/мл фиксировалась существенная величина аналитического сигнала, в последующих экспериментах использовали антибиотик именно этой концентрации — 3 мкг/мл. Для этого суспензии клеток инкубировались с антибиотиком при 30°C в течение различного временного интервала (5, 10, 20, 30 мин) и проводились измерения частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса. Было показано (рис. 6), что по-

сле 5 мин инкубации клеток штамма K-12 с антибиотиком происходило значительное увеличение величины сигнала. Дальнейшие изменения параметров клеточной суспензии *E.coli* K-12 незначительно зависели от времени воздействия антибиотика. Известно, что изменение проницаемости мембраны происходит сразу после контакта бактериальной клетки с препаратом. Поэтому, увеличение аналитического сигнала после 5 мин инкубации клеток штамма K-12 с антибиотиком может быть объяснено повреждением мембраны клеток и выходом из клетки макромолекул цитоплазмы.

Следовательно, регистрация изменений измеряемых параметров резонатора с суспензией клеток при воздействии на них антибактериальным препаратом позволяет сделать заключения о чувствительности исследуемых клеток к данному антибиотику.

Далее представляло интерес сравнить результаты, полученные с помощью метода электроакустического анализа микробных суспензий с данными, полученными при помощи стандартного микробиологического способа определения чувствительности микроорганизмов к полимиксину методом серийных разведений. В результате исследований показано, что наименьшая концентрация анти-

биотика полимиксина, подавляющая видимый рост *E.coli*, составила ~2,0 мкг/мл. Таким образом, данные, полученные двумя независимыми методами, практически совпадают.

Активность антибиотиков — это способность подавлять синтез клеточных компонентов микроорганизмов. Существуют стандартные методы определения активности антибиотиков: определение минимальной подавляющей концентрации в жидкой среде; определение минимальной подавляющей концентрации на плотной среде; определение активности антибиотиков методом диффузии в агаре и т.д. Поскольку изменение физических свойств суспензии клеток K-12 при инкубации с полимиксином мы связываем с проявлением их чувствительности к антибиотику, эти изменения могут зависеть от концентрации антибиотика. В этом случае величину электроакусти-

ческого эффекта можно было бы использовать для определения минимальной концентрации активности антибиотика. Данные, представленные на рис. 4 и 5 могут быть использованы для определения величины антибактериальной активности полимиксина. В отличие от стандартных методов, использование метода электроакустического анализа для определения активности антибиотиков в отношении микробных клеток имеет ряд преимуществ, к которым относится быстрота получения результата, простота анализа, кроме того, определение может быть осуществлено в минимальных объемах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир, 1984.
2. Antibiotic Resistance. Stephen H. Gillespie (ed.). Methods in Molecular Medicine, 48. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2001/
3. Cavalieri S.J., Biehle J.R., Sanders W.E. Synergistic activities of clarithromycin and antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobi Agents Chemother 1995; 39: 1542—1545.
4. Fleschin S., Bala C., Bunaciu A.A., Panait A., AboulEnein H.Y. Enalapril microbial biosensor. Preparativ Biochem Biotechnol 1998; 28: 261—269.
5. Galindo E., Lagunas F., Osuna J., Soberon X., Garcia J.L. A microbial biosensor for 6-aminopenicillanic acid. Enzym Microb Technol 1998; 23: 331—334.
6. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Gillespie SH, McHugh TD (eds.), Methods in Molecular Biology, vol. 642, Springer Science+Business Media, LLC, 2010.
7. Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981; 1: 347—358.
8. Guliy O.I., Bunin V.D., O'Neil D., Ivniiski D., Ignatov O.V. A new electro-optical approach to rapid assay of cell viability. Biosensor Bioelectron 2007; 23: 583—587.
9. Зайцев Б.Д., Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М., Васильев А.А. Новый способ подавления паразитных мод в пьезоэлектрическом резонаторе с поперечным электрическим полем. Письма в журн техн физ 2011; 37: 11: 27—33.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гулий Ольга Ивановна — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И.Вавилова; ведущий научный сотрудник Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института, Саратов

Зайцев Борис Давыдович — д. физ.-мат. н., заведующий лабораторией физической акустики Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова Российской академии наук, Саратов

Шихабудинов Александр Магомедович — к. физ.-мат. н., старший научный сотрудник лаборатории физической акустики Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова Российской академии наук, Саратов

Таким образом, впервые показана возможность регистрации чувствительности микробных клеток к антибактериальным препаратам и определения их антибактериальной активности на примере полимиксина методом электроакустического анализа клеточных суспензий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-07-00818 и № 16-07-00821.

10. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М., Маторя Л.Ю., Макарихина С.С., Игнатов О.В. Детекция микробных клеток с помощью электроакустического датчика. Микробиология 2013; 82: 2: 218—227.
11. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М., Дыкман Л.А., Староверов С.А., Караваева О.А., Павлий С.А., Игнатов О.В. Определение спектра литической активности бактериофагов методом акустического анализа. Биофизика 2015; 60: 4: 722—728.
12. Ballato A., Hatch E.R., Mizan M., Lukaszek T.J. Lateral field equivalent networks and piezocoupling factors of quartz plates driven in simple thickness modes. IEEE Trans on Ultrason, Ferroelectr Freq Contr 1986; 33: 4: 385—393.
13. Khan A., Ballato A. Lateral field excitation predictions for plates of langasite and isomorphs driven in simple thickness mode. IEEE/EIA Intern Freq Contr Symp and Exhibition 2000; 180—185.
14. Pinkham W., French L., Frankel D., Vetelino J. A lateral field excited acoustic wave pesticide sensor. Proc. IEEE Ultrason Symp 2005; 2279—2283.
15. Wark M., Kalanyan B., Ellis L., Fick J., Connel L., Neivandt D., Vetelino F. A lateral field excited acoustic wave sensor for the detection of saxitoxin in water. Proc of IEEE Ultrason Symp 2007; 1217—1220.
16. Ермаков, А.Д. Ермаков А.Д. Росс мед журн 2003;7: 10—12.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Мол клон М.: Мир, 1984.
18. Сазыкин, Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: учебное пособие для студентов высш. учеб. заведений / под ред. А.В. Катлинского. 3-е изд., стер. М.: Издательский центр «Академия», 2008.

Бородина Ирина Анатольевна — к. физ.-мат. н., старший научный сотрудник лаборатории физической акустики Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова Российской академии наук, Саратов

Ларионова Ольга Сергеевна — д.б.н., заведующий кафедрой микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Жничкова Елена Григорьевна — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Изучение антибактериальной активности и энергии связывания с пептидным лигандом гибридных антибиотиков ванкомицин—азитромицин и эремомицин—азитромицин

Е. Е. БЫКОВ, Е. П. МИРЧИНК, Е. Б. ИСАКОВА, Е. Н. БЫЧКОВА, Е. Н. ОЛСУФЬЕВА, А. Н. ТЕВЯШОВА

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

Study of Antibacterial Activity and Energy of Formation of Peptide Ligand Complexes With Hybrid Antibiotics Vancomycin—Azithromycin and Eremomycin—Azithromycin

E. E. BYKOV, E. P. MIRCHINK, E. B. ISAKOVA, E. N. BYCHKOVA, E. N. OLSUF'YEVA, A. N. TEVYASHOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Изучена антибактериальная активность гибридных антибиотиков ванкомицин—азитромицин (C11, C12 - карбонат) и эремомицин—азитромицин (C11, C12 - карбонат) и проведены квантово-химические расчёты энергии их взаимодействия с пептидным лигандом — модельным трипептидом α , ϵ -di-Ac-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala полужимпирическим методом PM6. Получены данные о геометрических параметрах комплексов антибиотиков с лигандом, энергиях их образования и влиянии состояния протонирования группы NHCH_3 . Выявлена корреляция между энергией образования комплекса гибридных антибиотиков с лигандом и антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий.

Ключевые слова: ванкомицин, эремомицин, азитромицин, гибридные антибиотики, антибактериальная активность, комплекс антибиотик—лиганд, квантово-химическое изучение, полужимпирический метод PM6.

Antibacterial activity of hybrid antibiotics vancomycin—azithromycin (C11, C12-carbonate) and eremomycin—azithromycin (C11, C12-carbonate) was evaluated. Quantum chemical calculations of complexes of hybrid antibiotics with a model tripeptide ligand α , ϵ -di-Ac-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala by the semi empirical PM6 method provided data on geometrical parameters of complexes along with the energy of their formation and the influence of protonation of the NHCH_3 group. A correlation between the energy of formation of antibiotics-ligand complexes and antibacterial activity of hybrid antibiotics against Gram-positive bacterial strains was found.

Keywords: vancomycin, eremomycin, azithromycin, hybrid antibiotics, antibacterial activity, antibiotic—ligand complex, quantum chemical calculations, semi empirical method PM6.

Введение

Природные гликопептидные антибиотики ванкомицин (1) и эремомицин (2) (рис. 1) высокоактивны в отношении широкого спектра грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, включая метилциллинорезистентные (MRSA), а также *Enterococcus* spp., *Clostridium difficile* и др., чувствительные и устойчивые к бета-лактамам, фторхинолонам и тетрациклинам [1, 2]. Механизм действия гликопептидных антибиотиков основан на ингибировании синтеза клеточной стенки бактерий путём их прочного связывания с N-ацил-*D*-Ala-*D*-Ala-фрагментом растущего пептидогликана [3]. Пять водородных связей между атомами пептида-мишени и «связывающего кармана» обеспечивают прочное удерживание антибиотиком мишени бактериальной клетки (рис. 2, а).

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, ул. Б. Пироговская, 11. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе. E-mail: chulis@mail.ru

Среди антибактериальных средств широкого спектра действия весьма эффективны макролидные антибиотики, которые активны в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий. Среди антибиотиков данного класса полусинтетический 15-членный макролид азитромицин (3) (см. рис. 1) обладает наилучшими фармакологическими характеристиками [4, 5]. Механизм действия макролидов основан на ингибировании синтеза белков, их мишень — пептидил-трансферазный центр на 50S субъединице рибосомы.

Однако даже такой высокоэффективный антибиотик резерва как ванкомицин (1) или широко применяемый антибиотик азитромицин (3) со временем становятся бессильны в борьбе с некоторыми штаммами бактерий, которые в результате мутации приобрели устойчивость к ним.

Гликопептидоустойчивые энтерококки (GRE) используют для построения бактериальной стенки не фрагмент-*D*-Ala-*D*-Ala, а депсипептид-*D*-Ala-*D*-Lactate (см. рис. 2, б) [6]. При этом образу-

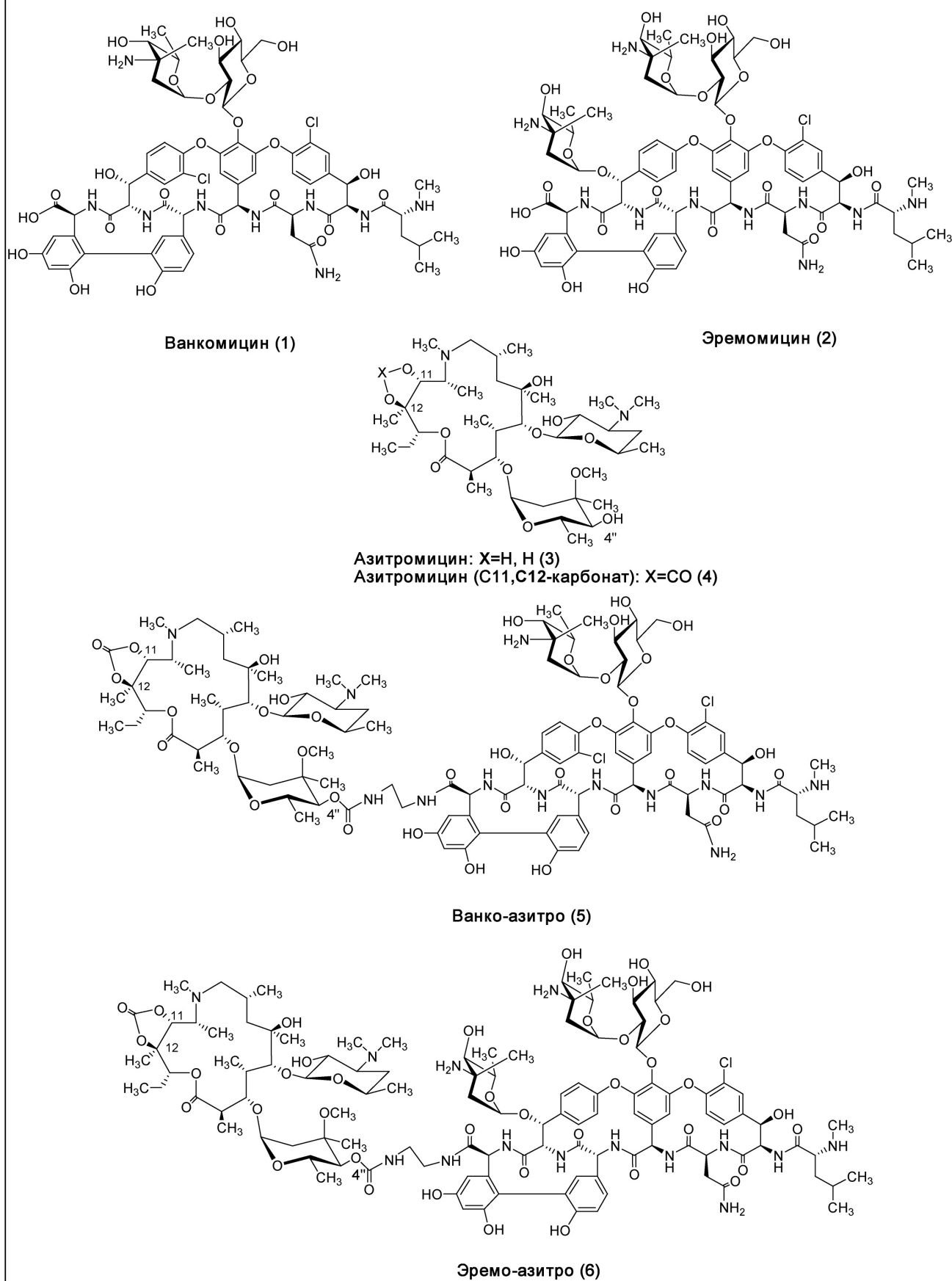


Рис. 1. Структуры антибиотиков ванкомицина (1), эремомицина (2), азитромицина (3), C11,C12-карбонатного аналога азитромицина (4) и их гибридных аналогов 5 и 6.

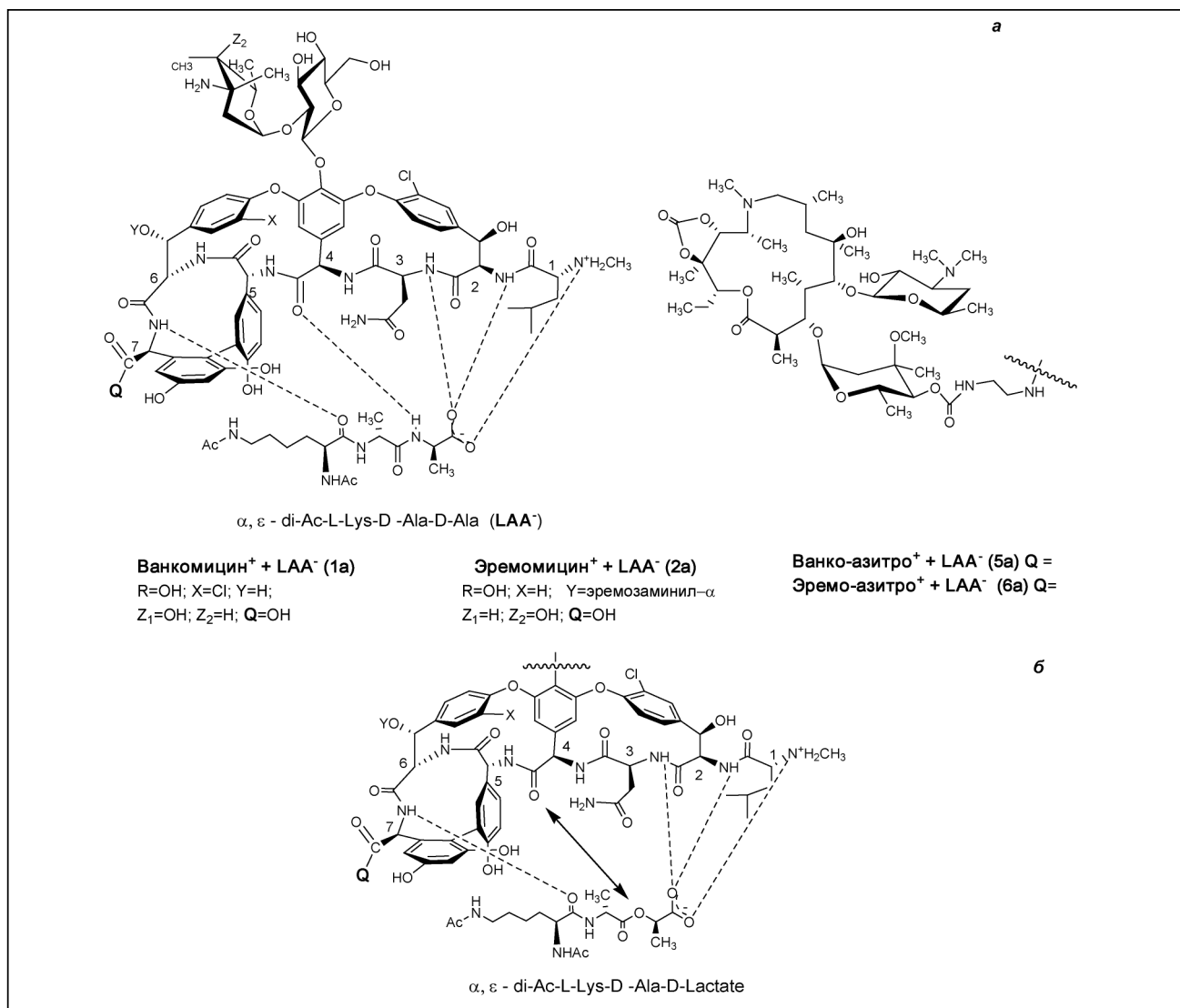


Рис. 2. Молекулярные комплексы антибиотиков с модельным пептидом α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (LAA^-) (а) – 1a, 2a, 5a и 6a и с модельным депсипептидом α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Lactate (б).

Пунктирными линиями показаны водородные связи, толстой стрелкой – отталкивание между атомами кислорода.

ются только четыре водородные связи, поскольку имеет место отталкивание между карбонатной группой остатка аминокислоты 4 и кислородом сложноэфирной группы депсипептида. Такой комплекс не стабилен, что приводит к резкому снижению антибактериальной активности антибиотика.

Для другого типа резистентности, т.н. резистентности среднего уровня GISA, описан иной механизм действия, который связан с мутацией, вызывающей перепроизводство несшитых цепочек предшественника пептидогликана. В результате увеличивается число остатков-D-Ala-D-Ala, и концентрации антибиотика оказывается недостаточно для полного ингибирования биосинтеза пептидогликана. Для азитромицина также выделены устойчивые клинические изоляты бактерий [7].

Резистентность бактерий к применяемым антибиотикам — одна из наиболее насущных проблем современной антибактериальной терапии [8], которая требует от исследователей создания новых антибактериальных средств, преодолевающих эту резистентность [9]. Высокоэффективные антибактериальные препараты нового поколения могут быть созданы путём направленной химической модификации наиболее активных природных антибиотиков [10].

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают гибридные структуры, в которых молекулы антибиотиков разных классов соединены между собой ковалентной связью [11, 12]. Такие препараты перспективны для лечения инфекционных болезней, вызванных мультирезистентными бактериями. Из литературных

источников известно, что свойства гибридных структур не являются простым сложением свойств составляющих их антибиотиков. Ковалентно-связанные антибиотики могут обладать новыми свойствами и иметь более широкий спектр действия, чем каждый из компонентов гибридной структуры или при сочетанном их применении. Изучение механизмов действия таких гибридных антибиотиков особенно важно.

Настоящая работа посвящена изучению антибактериальной активности гибридных антибиотиков ванкомицин — азитромицин-(C11, C12-карбонат) (5) и эремомицин — азитромицин-(C11, C12-карбонат) (6), а также квантово-химическим расчётам энергии их взаимодействия с пептидным лигандом — модельным трипептидом α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala полуэмпирическим методом PM6.

Материал и методы

В работе использованы гидрохлорид ванкомицина (сокращенно ванко) (1) и азитромицин дигидрат (сокращенно азитро) (3) — фирмы Sigma-Aldrich (США). Сульфат эремомицина (сокращенно эremo) (2) получен на опытной установке ФГБНУ «НИИНА». Азитромицин (карбонат — C11, C12) (4), карбоксамид ванкомицина и 4''-О-(2-аминоэтилкарбамоил) азитромицина (карбонат — C11, C12) (сокращенно ванко-азитро) (5) и карбоксамид эремомицина и 4''-О-(2-аминоэтилкарбамоил) азитромицина (карбонат — C11, C12) (сокращенно эremo-азитро) (6) получены в ФГБНУ «НИИНА» [13]. Определение антибактериальной активности антибиотиков (1—3, 5 и 6) проводилось с использованием микрометода определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) методом серийных разведений в бульоне Мюллера—Хинтона с использованием 96-луночных стерильных планшетов [14—16]. Метод разведения основан на использовании двойных последовательных разведений исследуемого вещества от максимальной концентрации к минимальной. При этом исследуемое вещество в различных концентрациях вносят в жидкую питательную среду (бульон). Оценку роста бактериальных культур проводят визуально, сравнивая рост микроорганизмов в присутствии изучаемых

тест-соединений с ростом бактериальных культур без них. Первую наименьшую концентрацию исследуемого вещества (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост, принято считать минимальной подавляющей концентрацией (МПК, мкМ). Все квантово-химические расчёты энергии взаимодействия антибиотиков с пептидным лигандом — модельным трипептидом α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala проведены с использованием стандартного пакета программ Spartan-10 [17] полуэмпирическим методом PM6 [18].

Результаты и обсуждение

В гибридных структурах ванко-азитро (5) и эremo-азитро (6) антибиотики соединены между собой ковалентно через спейсер — 2-аминоэтилкарбамоильную группу с использованием функциональных групп, которые непосредственно не участвуют в связывании с мишенью. Согласно данным литературы, такими группами являются для гликопептидов 1 или 2 концевая карбоксильная группа и для азитромицина (3) — гидроксильная группа при C-4'' остатка L-кладинозы [19]. Кроме того, многочисленные исследования показали, что модификация 4''-гидроксильной группы остатка кладинозы способствует преодолению резистентности, обусловленной модификацией нуклеотида A2058 в сайте связывания рибосомы с макролидом, в то время как трансформация 11 и 12 гидроксильной групп с получением циклического карбоната или карбамата способствует преодолению резистентности, связанной с активным транспортом антибиотика из клетки [20].

Результаты изучения антибактериальной активности гибридных антибиотиков ванкомицин — азитромицин (C11, C12-карбонат) (5) и эремомицин — азитромицин (C11, C12-карбонат) (6) в сравнении с исходными 1, 2 и азитромицином (3) представлены в табл. 1.

В работе были использованы клинические изоляты девяти штаммов грамположительных

Таблица 1. Изучение антибактериальной активности антибиотиков (1–3) и гибридных аналогов (5, 6)

Штамм	МПК, мкМ*				
	1	2	3	5	6
Грамположительные					
I <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 ATCC	0,7	0,15	1,2	0,4 ↑	0,8 ↓
II <i>Staphylococcus epidermidis</i> 533	0,3 ≈	0,15	2,5	0,4 ≈	0,8 ↓
III <i>Staphylococcus aureus</i> 3797 (GISA)	2,7	2,4	>39,0	1,7 ↑	1,6 ↑
IV <i>Staphylococcus aureus</i> 1025 (GISA)	5,4	9,6	19,7	>13,4	3,2 ↑
V <i>Enterococcus faecium</i> 568	0,7	0,15	9,8	0,4 ↑	0,8 ↓
VI <i>Enterococcus faecium</i> 569 (GRE)	>21,4	>19,2	9,8	>13,4	3,2 ↑
VII <i>Enterococcus faecalis</i> 560 (GRE)	>21,4	>19,2	>39,0	13,4	6,5 ↑
VIII <i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC (S)	1,3	0,6 ≈	9,8	0,4 ↑	0,8 ≈
IX <i>Streptococcus agalactis</i> 52	5,46	0,6	>39,0	13,4	3,2 ↓
Грамотрицательный					
X <i>E.coli</i> 25922 ATCC	>21,4	>19,2	9,8	>13,4	>13,0

Примечание. * — Увеличение активности (МПК, мкМ) аналогов 5 или 6 в результате присоединения к антибиотику 1 или 2 аналога азитромицина (4) отмечено значком ↑ и жирным шрифтом, причем два значка ↑↑ обозначают существенное, принципиальное увеличение активности. Снижение активности аналогов 5 или 6 в результате присоединения к антибиотику 1 или 2 аналога азитромицина (4) отмечено значком ↓ и курсивом. Отсутствие влияния присоединенного 4 в гибридных аналогах 5 и 6 на активность исходных 1 и 2 отмечено значком ≈.

Таблица 2. Энергия связывания антибиотиков 1, 2 и 5, 6 с лигандом α,ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (LAA⁻) с образование комплексов 1а, 2а и 5а, 6а (метод РМ6); N-концевая группа пептидного кора протонирована (NHCH₃⁺)

Энергия связывания	Ванко (1а) (1 ⁺ + LAA ⁻)	Эремо (2а) (2 ⁺ + LAA ⁻)	Ванко-азитро (5а) (5 ⁺ + LAA ⁻)	Эремо-азитро (6а) (6 ⁺ + LAA ⁻)
ΔG_{298} , * ккал/моль	-108,6	-97,7	-122,5	-101,5

Примечание. *Величина ΔG_{298} , полученная методом B3LYP/6-31G*, составляет - 122,7 ккал/моль [21].

Таблица 3. Энергия связывания антибиотиков 1, 2 и 5, 6 с лигандом α,ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (LAA⁻) с образование комплексов 1б, 2б и 5б, 6б (метод РМ6), N-концевая группа пептидного кора не протонирована (NHCH₃)

Энергия связывания	Ванко (1б) (1 + LAA ⁻)	Эремо (2б) (2 + LAA ⁻)	Ванко-азитро (5б) (5 + LAA ⁻)	Эремо-азитро (6б) (6 + LAA ⁻)
ΔG_{298} , * ккал/моль	-45,0	-61,0	-51,09	-42,9

Примечание. *Величина ΔG_{298} , полученная методом B3LYP/6-31G*, составляет - 87,7 ккал/моль [22].

бактерий — стафилококков, энтерококков и стрептококка (I—IX) и одного штамма грамотрицательной бактерии — *E.coli* (X), а также два штамма стафилококка с пониженной чувствительностью к гликопептидам GISA-типа (III, IV) и два резистентных штамма энтерококков GRE-типа (VI, VII).

Было установлено, что ковалентное присоединение аналога азитромицина (4) к ванкомицину (1) («гибрид» 5) увеличивает активность гликопептида в 1,3—3,2 раза в отношении 5 штаммов грамположительных бактерий — стафилококков и энтерококков (I, II, III, V, VIII). В отношении стрептококка IX гибридный аналог (5) не активен.

Для эремомицина (2) установлена иная закономерность в изменении антибактериальной активности при ковалентном присоединении к нему аналога азитромицина (4) с образованием «гибрида» (6). По сравнению с высокой активностью «гибрида» на основе ванкомицина (5), активность «гибрида» на основе эремомицина (6) в отношении чувствительных штаммов I, II, V, IX ниже активности исходного 2 в 1,3—1,8 раз. Однако в отношении стрептококка IX, в отличие от результата для «гибрида» 5, «гибрид» 6 показывает заметную активность (МПК=3,2 мкМ), хотя и сниженную в 5,3 раза по сравнению с таковой для исходного антибиотика 2 (МПК=0,6 мкМ).

В отличие от гликопептидов, которые действуют на внешней стороне клеточной стенки бактерии, азитромицину (3), чтобы достигнуть своей мишени — рибосомы 50S, необходимо проникнуть внутрь клетки. Макролидный антибиотик 3 высокоактивен в отношении 2 штаммов чувствительных стафилококков (I, II), но не активен или малоактивен в отношении стафилококков III, IV и стрептококка IX и умеренно активен в отношении 3 штаммов грамположи-

тельных бактерий V, VI, VIII и грамотрицательной бактерии (X).

Гликопептидные антибиотики 1 и 2 не активны в отношении грамотрицательных бактерий, включая штамм *E.coli* 25922 ATCC (МПК > 13,4 мкМ), поскольку они не могут преодолеть наружную оболочку, которую имеют эти бактерии, и не могут непосредственно влиять на биосинтез пептидогликана внутренней стенки бактерии. Отсутствие у гибридных структур 5 и 6 активности в отношении грамотрицательного штамма бактерии *E.coli* 25922 ATCC (МПК > 13,4 мкМ) так же свидетельствует об их неспособности проходить через наружный слой клетки бактерии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ковалентное присоединение молекулы аналога азитромицина (4) к гликопептиду 1 или 2 («гибриды» 5 и 6) может существенно менять антибактериальную активность исходных гликопептидов.

Установлено, что исходные гликопептиды 1 и 2, и их гибридные аналоги 5 и 6 высокоактивны в отношении чувствительных штаммов грамположительных бактерий и не активны в отношении грамотрицательной бактерии. Следовательно, можно с большой вероятностью предположить, что активность в отношении чувствительных штаммов бактерий гибридных антибиотиков 5 и 6 определяется не за счёт азитромициновой части, а за счёт гликопептидной части гибридной молекулы. В свою очередь, механизм действия «гибридов» заключается в способности присоединяться к мишени -D-Ala-D-Ala растущего пептидогликана на поверхности клетки.

Квантово-химические расчёты методом РМ6, показали, что гибридные аналоги 5 и 6 так же способны связываться с модельным лигандом — пептидом α,ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala, как и исходные гликопептиды 1 и 2 (рис. 2, а, табл. 2, 3). На рис. 3—6 представлены 3D-модели



Рис. 3. 3D-Модель Стюарта-Бриггеба комплекса ванкомицина с α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (1a), рассчитанная методом РМ6; атомы лиганда выделены белым цветом.

Стюарта-Бриггеба комплексов этих антибиотиков 1a, 2a и их гибридных аналогов 5a и 6a с модельным лигандом.

На рис. 3—6 видно, что для всех рассматриваемых структур характер расположения лиганда относительно связывающего кармана имеет практически одинаковый характер взаимодействия лиганда с ключевым фрагментом связывающего кармана-D-Ala-D-Ala. В случае ванкомицина (1) остаток L-лизина отдалён от пептидного кора, а в случае эремомицина — приближен к С-концевому фрагменту пептидного кора антибиотика. В «гибриде» ванкомицина (5) азитромициновый фрагмент находится на одной линии (оси) с пептидным кором, тогда как в «гибриде» эремомицина (6) азитромициновый фрагмент находится под углом $\sim 140^\circ$ от воображаемой линии с пептидным кором антибиотика в сторону, противоположную от лиганда.

Методом РМ6 было показано, что для связывания лиганда α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala с ванкомицином (1) (при условии протонирования концевой аминогруппы группы (NHCH_3^+) пептидного кора) ΔG_{298} взаимодействия составляет большую величину (-108,6 ккал/моль), чем таковая для связывания эремомицина (2) с тем же лигандом (-97,7 ккал/моль) (табл. 2). Установлено, что присоединение остатка азитро-

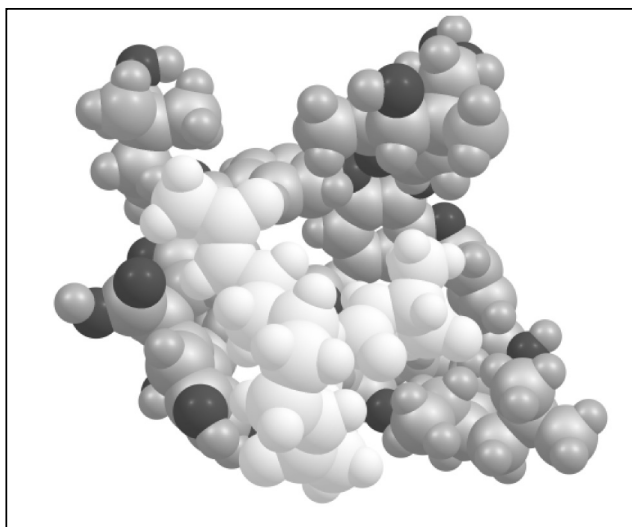


Рис. 4. 3D-Модель Стюарта-Бриггеба комплекса эремомицина с α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (3a), рассчитанная методом РМ6; атомы лиганда выделены белым цветом.

мицина к ванкомицину («гибрид» 5) приводит к усилению связывания антибиотика с лигандом, о чём свидетельствует увеличение ΔG_{298} на 13,9 ккал/моль. В то же время для эремомицина присоединение остатка азитромицина (с образованием «гибрида» 6) увеличивает энергию связывания ΔG_{298} антибиотика с пептидом незначительно — на 3,8 ккал/моль.

Если же группа N-концевая группа пептидного кора не протонирована (NHCH_3), расчёты полумпирическим методом РМ6 показывают, что эремомицин 2 связывается с лигандом LAA- сильнее, чем ванкомицин 1: ΔG_{298} для комплексов 2б и 2в соответственно равны -61,0 и -45,0 ккал/моль (табл. 3). Присоединение остатка азитро (4) к ванкомицину (1) приводит к увеличению энергии связывания гликопептидного антибиотика с модельным пептидом независимо от того, что N-концевая группа аминогруппа пептидного кора протонирована (NHCH_3^+) (комплекс 5a) ΔG_{298} (на 13,9 ккал/моль) или не протонирована (NHCH_3) (комплекс 5б) (на 6,1 ккал/моль). Т.е. влияние положительного заряда на концевой аминогруппе для связывания с лигандом в случае ванкомицина не существенно.

Для эремомицина (2) в случае протонированной формы (NHCH_3^+) ковалентное присоединение остатка азитро (4) (гибридное соединение 6) приводит к незначительному увеличению энергии связывания ΔG_{298} с лигандом на 3,8 ккал/моль (комплекс 6a). А в случае непротонированной формы эремомицина (2) (NHCH_3) ковалентное присоединение к нему остатка азитромицина (комплекс 6б) приводит к существенному снижению энергии связывания с лигандом

ΔG_{298} на 18,1 ккал/моль (комплекс 5б). Т.о. наличие положительного заряда на концевой аминогруппе для эремомицина имеет существенное значение. В целом, протонированная форма антибиотиков (1а, 2а, 5а и 6а) связывается с лигандом сильнее, чем непротонированная (1б, 2б, 5б и 6б).

Иными словами, присутствие остатка азитромицина (гибрид 5) на C-концевой группе пептидного кора ванкомицина (1) усиливает его взаимодействие с модельным лигандом, независимо от заряда на N-концевой группе пептидного кора. И, напротив, в случае эремомицина (2), присутствие остатка азитромицина (гибрид 6) заметно снижает значение энергии связывания ΔG_{298} с лигандом, если N-концевая группа не протонирована (NHCH_3^+), или не существенно влияет на изменение величины энергии связывания с лигандом, если N-концевая группа протонирована.

Гибридный аналог ванкомицина (5) аналогично исходному ванкомицину (1) не подавляет в эксперименте *in vitro* рост устойчивого штамма стафилококка IV (GISA-типа), а также рост устойчивых штаммов энтерококков VI, VII (GRE типа), у которых мишень D-Ala-D-Ala заменена на -D-Ala-D-Lactate (рис. 2, б).

В отношении резистентных штаммов стафилококков (GISA) III, IV активность гибридного аналога эремомицина (6) по сравнению с таковой для исходного 2 увеличивается в 1,5 и 3 раза, соответственно. Этот аналог 6, в отличие аналога ванкомицина 5, также проявляет заметную активность в отношении резистентных штаммов энтерококков VI, VII (GRE типа) — МПК ~3,2 и 6,5 мкМ. Активность гибридного аналога эремомицина 6 по сравнению с таковой для гибридного аналога ванкомицина 5 может быть объяснена иным, отличным от

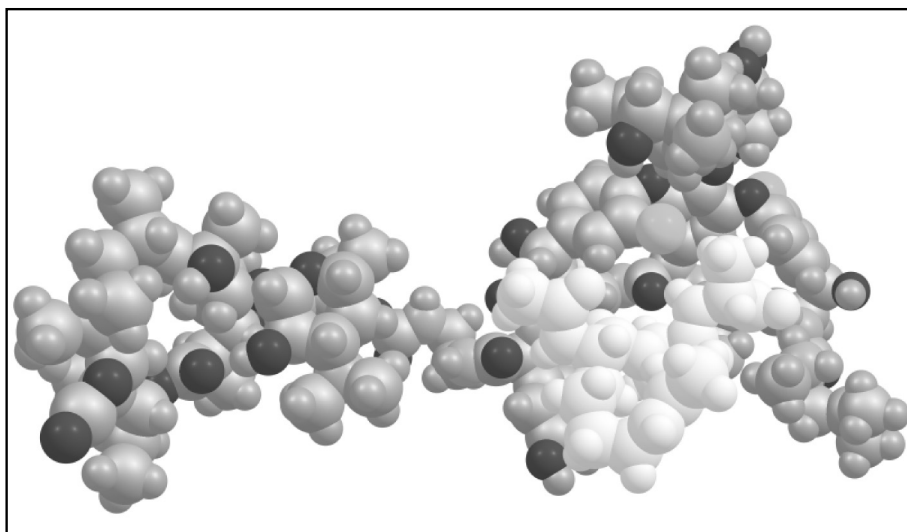


Рис. 5. 3D-Модель Стюарта-Бриглеба комплекса «гибрида» ванко-азитро с α,ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (4а), рассчитанная методом РМ6; атомы лиганда выделены белым цветом.

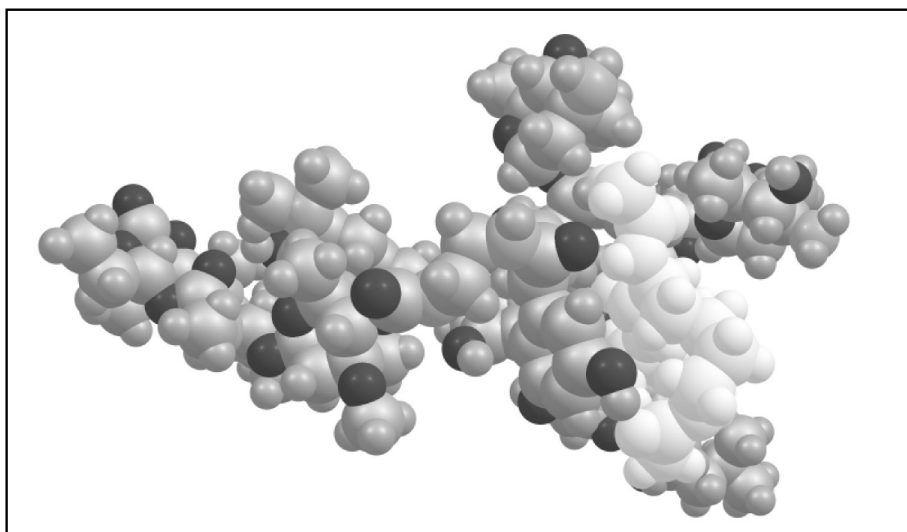


Рис. 6. 3D-Модель Стюарта-Бриглеба комплекса «гибрида» эремо-азитро с α,ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (5а), рассчитанная методом РМ6; атомы лиганда выделены белым цветом.

классического типа связывания с мишенями -D-Ala-D-Ala или -D-Lactate-D-Ala, механизмом действия. В работах [23, 24] описаны возможные модели механизмов действия на бактериальную клетку аналогов эремомицина, преодолевающих резистентность грамположительных штаммов типа GRE и GISA и не связанных с взаимодействием с классическими мишенями.

Выводы

1. Присоединение молекулы азитромицинового производного 4 к ванкомицину (1) или эремомицину (2) не приводит к потере анти-

бактериальной активности в отношении грамположительных бактерий (I, II, III, V и VIII), а квантово-химические расчеты подтверждают, что их активность определяется сродством к мишени *-D-Ala-D-Ala*.

2. Более высокая активность «гибрида» ванкомицина с азитромицином 5 по сравнению с активностью «гибрида» эремомиицина с азитромицином 6 в отношении чувствительных штаммов грамположительных бактерий (I, II, III, V и VIII), коррелирует со значениями энергий связывания ΔG_{298} гибридных аналогов с модельным пептидом α, ϵ -di-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala, полученных квантово-химическими расчётами для непротонированной формы молекулы антибиотика.

ЛИТЕРАТУРА

- Svetitsky S., Leibovich L., Paul M. Comparative Efficacy and Safety of Vancomycin versus Teicoplanin: Systematic Review and Meta-Analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 10: 4069–4079.
- Binda E., Marinelli F., Marcone G. L. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics* 2014; 3: 572–594.
- Barna J. C. J., Williams D.H. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Ann Rev Microbiol* 1984; 38: 339–357.
- Zuckerman J. M., Qamar F., Bono B. R. Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycolcyclines (tigecycline). *Med Clin North Am* 2011; 95: 4: 761–791.
- Сазыкин Ю. О., Иванов В. П., Салова Т. В. Кетолиды — производные эритромицина с активностью против макролидорезистентных бактерий. *Антибиотики и химиотерапия* 2000; 2: 3–4. / Sazykin Ju. O., Ivanov V. P., Salova T. V. Ketolidy — proizvodnyye eritromicina s aktivnost'ju protiv makrolidorezistentnykh bakterij. *Antibiotiki i khimioter* 2000; 2: 3–4. [in Russian]
- Bugg, T. D. H., Wright, G. D., Dutka-Malen, S. et al. Molecular basis of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 1991; 30: 10408–10415.
- Веселов А. В., Козлов Р. С. Азитромицин: современные аспекты клинического применения. *Клин микроб антимикроб химиотерапия* 2006; 8: 1: 18–32. / Veselov A. V., Kozlov R. S. Azitromycin: sovremennyye aspekty klinicheskogo primeneniya. *Klin mikrob antimikrob khimioter* 2006; 8: 1: 18–32. [in Russian]
- Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Micriobiology and Molecular Biology Reviews* 2010; 74: 3: 417–433.
- Renwick M. J., Brogan D. M., Mossialos E. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *J. Antibiot.* 2015; 69: 73–88.
- Butler M. S., Blaskovich M. A. T., Cooper M. A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J. Antibiot.*, doi: 10.1038/ja.2016.72; published online 29 June 2016.
- Pokrovskaya V., Baasov T. Dual-acting hybrid antibiotics: a promising strategy to combat bacterial resistance. *Expert Opin Drug Discovery* 2010; 5: 883–902.
- Тевяшова А. Н., Олсуфьева Е. Н., Преображенская М. Н. Создание антибиотиков двойного действия как путь поиска новых перспективных лекарственных препаратов *Успехи химии* 2015; 84: 1: 61–97. / Tevjashova A. N., Olsuf'eva E. N., Preobrazhenskaja M. N. Sozdanie antibiotikov dvojnogo dejstviya kak put' poiska novykh perspektivnykh lekarstvennykh preparatov *Uspekhi khimii* 2015; 84: 1: 61–97. [in Russian]
- Патент РФ, № 2578604. Опубликовано 27.03.2016, бюлл. №9. / Patent RF, № 2578604. Opublikovan 27.03.2016, bjull. №9. [in Russian]
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04). Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации. Онищенко Г. Г.: 04.03.2004 г. / Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam (Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04). Utverzhdeny i vvedeny v dejstvie Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossijskoj Federacii. Onishhenko G. G.: 04.03.2004 g. [in Russian]
- Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств / часть первая — Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2012. / Rukovodstvom po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv / chast' pervaja — Izdanie FGBU «NCJeSMP» Minzdravsocrazvitija Rossii, 2012. [in Russian]
- Рекомендациями Национального Комитета Клинических Лабораторных Стандартов США (NCCLS), [NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antibacterial Susceptibility Testing, USA 2000]. / Rekomendacijami Nacional'nogo Komiteta Klinicheskikh Laboratornykh Standartov SSHA (NCCLS), [NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antibacterial Susceptibility Testing, USA 2000]. [in Russian]
- <https://www.wavefun.com/>
- Lee J.-G., Sagui C., Roland C. New Algorithms for Macromolecular Simulation in Book: New Algorithms for Macromolecular Simulation 2006; 49: 343–353. Leimkuhler B., Chipot C., Elber R., Laaksonen A., Schlick A. M. T., Schutte C., Skeel R. (Eds.) Springer.
- C. Walsh. Antibiotics: Actions, origins, resistance 2003: 23–36. Washington, DC: ASM Press.
- Ma C., Liu Z., Song H., Jiang R., He F., Ma S. Synthesis and antibacterial activity of novel 11, 12-cyclic carbonate azithromycin 4''-O-carbamate derivatives. *J. Antibiotics* 2010; 63: 3–8.
- Yang Z., Vorpapel E. R., Laskin J. Experimental and Theoretical Studies of the Structures and Interactions of Vancomycin Antibiotics with Cell Wall Analogues. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 13013–13022.
- Yang Z., Vorpapel E. R., Laskin J. Influence of the Charge State on the Structures and Interactions of Vancomycin Antibiotics with Cell-Wall Analogue Peptides: Experimental and Theoretical Studies [a] *Chem Eur J* 2009; 15: 2081–2090.
- Printsevskaya S. S., Pavlov A. Y., Olsufyeva E. N. et al. Synthesis and mode of action of hydrophobic derivatives of glycopeptide antibiotic eremomycin and des-(N-methyl-D-leucyl)eremomycin against glycopeptide-sensitive and -resistant bacteria. *J Med Chem* 2002; 45: 1340–1345.
- Chang J., Zhou H., Preobrazhenskaya M. et al. The carboxyl terminus of eremomycin facilitates binding to the non-D-Ala-D-Ala segment of the peptidoglycan pentapeptide stem. *Biochemistry* 2016; 55: 3383–3391.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Быков Евгений Евгеньевич — к.х.н., с.н.с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Мирчинк Елена Павловна — д.м.н., в.н.с. лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Исакова Елена Борисовна — н.с. лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

3. В отличие от гибридного аналога ванкомицина (5), гибридный аналог эремомиицина (6) проявляет заметную активность в отношении резистентных штаммов стафилококков (GISA) (III, IV) и в отношении резистентных штаммов энтерококков VI, VII (GRE типа), которую можно объяснить влиянием остатка азитромицина, присоединённого по C-концевой группе пептидного коря антибиотика 2.

Благодарности.

Работа А. Н. Тевяшовой выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-60110.

Бычкова Елена Николаевна — н.с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Олсуфьева Евгения Николаевна — д.х.н., гл.н.с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Тевяшова Анна Николаевна — д.х.н., в.н.с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Антибактериальная активность полимерной формы джозамицина

Е. Д. НИКОЛЬСКАЯ¹, О. А. ЖУНИНА¹, М. Б. СОКОЛ¹, М. В. ФОМИЧЕВА¹, Н. В. ГУКАСОВА²,
Е. А. ВОРОНЦОВ², Н. Г. ЯББАРОВ¹, О. Г. ТЕРЕЩЕНКО¹, Е. С. СЕВЕРИН¹

¹ Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Antibacterial Activity of the Polymeric Form of Josamycin

E. D. NIKOLSKAYA¹, O. A. ZHUNINA¹, M. B. SOKOL¹, M. V. FOMICHEVA¹, N. V. GUKASOVA²,
E. A. VORONTSOV², N. G. YABBAROV¹, O. G. TERESHCHENKO¹, E. S. SEVERIN¹

¹ All-Russian Scientific Center for Molecular Diagnostics and Treatment, Moscow

² National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

Разработана полимерная форма джозамицина путём включения данного антибиотика в частицы сферической формы субмикронного размера из сополимера молочной и гликолевой кислот (ПМГК 50/50). Средний диаметр частиц не превышает 150 нм, а значение дзета-потенциала составляет -35 мВ. Полимерная форма обладает антибактериальной активностью в отношении грамположительных, грамотрицательных, а также атипичных бактерий. Более высокая (в 8 раз) антибактериальная активность по сравнению с субстанцией была обнаружена у препарата в отношении *Enterococcus faecalis*. Результаты исследований специфической активности препаратов *in vivo* на модели стафилококкового сепсиса мышей показали увеличение эффективности исследуемой полимерной формы в 1,5 раза по сравнению с субстанцией джозамицина.

Ключевые слова: джозамицин, сополимер молочной и гликолевой кислот (ПМГК 50/50), полимерные частицы, антибактериальная активность.

The polymeric form of josamycin was developed by loading of the antibiotic into spherical submicron particles made of poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA 50/50) by double emulsion method. The average diameter and zeta-potential of particles synthesized were less than 150 nm and -35 mV respectively. Polymeric form showed antimicrobial activity against gram-positive, gram-negative, and atypical bacteria. The highest antibacterial activity compared to substance (more than 8-fold) was detected against *Enterococcus faecalis*. The results of *in vivo* studies of specific activity of drugs on the model of staphylococcal sepsis in mice showed an increase in the efficacy of the studied polymeric form by 1.5-fold compared with the josamycin substance.

Keywords: josamycin, poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA 50/50), polymeric particles, antibacterial activity.

Введение

Одной из причин недостаточной эффективности используемых антибактериальных препаратов является их низкая селективность, что ведёт к необходимости высоких доз и увеличенной кратности приёма препарата при его введении в организм. Большая часть подвергается биотрансформации, не оказав антибактериального действия. В связи с этим возникает необходимость введения избыточного количества антибиотика, что приводит к возникновению серьёзных токсических эффектов и развитию микробной резистентности в отношении используемых лекарственных средств [1, 2].

Многочисленные данные литературы, а также результаты, полученные нами ранее по исследованию ряда противотуберкулёзных антибиоти-

ков, показывают, что включение лекарственных субстанций в полимерные частицы позволяет успешно решать описанные выше проблемы для данного класса препаратов. Более того, лекарственные формы с замедленным высвобождением активно действующих веществ позволяют снизить кратность приёма препарата в течение суток до одного раза [3–6].

Одним из широко используемых антибиотиков является джозамицин — 3-ацетат-4в-(3-метилбутоат) лейкомицин V и в виде пропионата — природный 16-членный антибиотик-макролид, продуцируемый актиномицетом *Streptomyces narbonensis* (рис. 1). Джозамицин используется при лечении инфекций верхних и нижних отделов дыхательных путей, дифтерии, скарлатины, инфекций полости рта, хламидийных, микоплазменных и смешанных инфекций мочевыводящих путей и половых органов. С 2012 г. этот антибиотик включен в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) [7–10].

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: *E-mail: olga_yarova@bk.ru

Ранее был разработан и запатентован в РФ новый способ получения лекарственных препаратов регулируемого действия на основе цикloserина, пипразинамида и изониазида, включенных в полимерные частицы [11]. Указанный метод получения полимерных форм антибиотиков отличался простотой его реализации и приводил к созданию препаратов с высокой степенью специфической активности. Данные препараты представляли растворы указанных антибиотиков, полимера, стабилизатора эмульсии и диуретика в диметилсульфоксиде (ДМСО). Композиции антибиотиков могли быть использованы перорально, после разбавления их водой и получения суспензии наноразмерных частиц. Следует отметить, что в медицинской практике ДМСО широко применяют в комплексной терапии ревматоидного артрита, болезни Бехтерева, дискоидной красной волчанки, тромбоза, экземы, фурункулеза, амилоидоза и пр. [12–15].

В целях решения проблем, связанных с токсичностью джозамицина, а также исследования принципиальной возможности применения данного подхода для получения полимерных частиц с антибиотиками других классов, в частности макролидов, нами были проведены эксперименты по разработке полимерной формы с включением указанного антибиотика. Новизна работы определяется отсутствием опубликованных научно-практических данных о создании подобных форм джозамицина. Кроме того, технология получения предлагаемой полимерной формы и её состав запатентован авторским коллективом [16].

В качестве объекта для изучения противомикробной активности полученного препарата *in vivo* была выбрана модель сепсиса, вызванного золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*). Это обусловлено тем, что стафилококки — чрезвычайно распространённые представители микрофлоры кожи и слизистых человека. Так, например, среди возбудителей больничных инфекций *S. aureus* занимает второе по частоте место, а также вызывает различные заболевания у человека и легко приобретает устойчивость к антимикробным препаратам [17–20].

Таким образом, разработка новых лекарственных препаратов или новых форм уже известных препаратов, обладающих высокой противо-

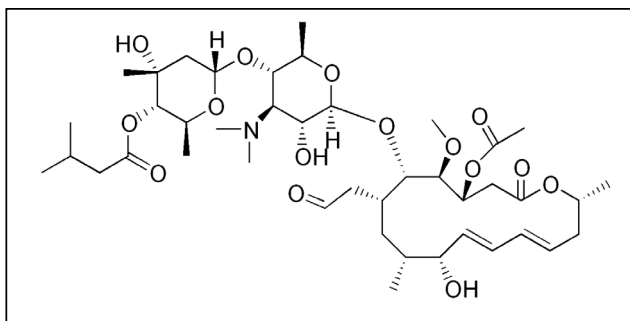


Рис. 1. Структура джозамицина.

микробной активностью, в частности против *S. aureus*, является актуальной задачей.

Материал и методы

В работе использованы: субстанция джозамицина (Sigma-Aldrich, США); сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA 50/50, Poly(DL-lactide-co-glycolide), inherent viscosity: 0,17 dL/g in HFIP (LACTEL Absorbable Polymers, США); поливиниловый спирт (PVA, ПВС), 87–90% hydrol., average mol. wt. 30000–70000; (Sigma-Aldrich, США); D-маннитол (ICN Biomedicals Inc., США); диметилсульфоксид (ДМСО, DMSO), min. 99,5 % (Riedel-de Haën, ФРГ), триптиказо-соевый бульон (Sigma-Aldrich, США), агар бактериологический (Sigma-Aldrich, США).

Получение полимерной формы джозамицина. В трёхгорлую стеклянную колбу, снабжённую мешалкой, термометром и обратным холодильником, последовательно вносили: джозамицин, полимер, D-маннитол, ПВС и ДМСО в количествах, указанных в табл. 1 (в процентных соотношениях). Смесь перемешивали и нагревали на колбонагревателе при 50–60°C до полного растворения твёрдой фазы, после чего охлаждали до комнатной температуры в течение 20–30 мин. Состав композиции представлен в табл. 1. Указанное выше средство представляет собой прозрачную однородную жидкость. При добавлении к воде в соотношении от 1:5 до 1:20 образуется устойчивая опалесцирующая суспензия.

Определение размеров и дзета-потенциала полимерных частиц. Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния, а дзета-потенциал — электрофоретическим методом. Из испытуемого образца приготавливали суспензию с концентрацией 1 мг/мл. После чего проводили измерения с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Великобритания) с использованием стандартизованного протокола исследования (SOP).

Анализ морфологии полимерных частиц методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для проведения данного анализа 5–10 мкл раствора исследуемых образцов полимерных частиц наносили на свежеионизированные угольно-формваровые пленки-подложки, через 2 мин избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой и препараты контрастировали 1% водным раствором ацетата уранила. Препараты просматривали в электронном микроскопе JEOL 100CX (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Негативы

Таблица 1. Состав полимерной формы джозамицина

№ п/п	Наименование компонента	% масс.
1	Джозамицин	2,95–3,05
2	ПМГК 50/50	2,95–3,05
3	D-Маннитол	2,95–3,05
4	Поливиниловый спирт	1,45–1,55
5	Диметилсульфоксид	Остальное, до 100%

(увеличение в 20 000—50 000 раз) сканировали с разрешением 1200 dpi (dots per inch — точек на 1 дюйм).

Изучение противомикробной активности полимерной формы джозамицина *in vitro*. Определение противомикробной активности образцов полимерной формы джозамицина и субстанции в отношении тест-культур грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов осуществляли методом серийных микроразведений в жидкой среде в соответствии с рекомендациями МУК 4.2.1890-04 при визуальной регистрации видимого роста [21]. Динамическое измерение оптической плотности проводили с помощью многоканального спектрофотометра Bioscreen (Labsystems) при длине волны 610 нм с интервалом 20 мин. Планшеты с бактериальными суспензиями инкубировали при 37°C в термостатируемом модуле прибора. Исходная концентрация микроорганизмов составляла 5×10^5 КОЕ/мл. Противомикробную активность препаратов определяли по значениям минимальной подавляющей рост микроорганизма концентрации (МПК). В качестве тест-культур были использованы эталонные штаммы — *Staphylococcus aureus* ATCC 29 213, метициллинорезистентный *S.aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* (ATCC 25922), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Изучение противомикробной активности полимерной формы джозамицина *in vivo*. Изучение противомикробной активности полимерной формы джозамицина *in vivo* проводили на модели сепсиса, вызванного *S.aureus* (штамм 10, адаптированный к мышам) при внутривенном способе заражения. В качестве сравнения применяли субстанцию джозамицина в эквивалентном количестве.

В опытах использовали самок мышей линии SHK массой 22—25 г. Животные содержались в виварии на стандартном рационе брикетированных кормов со свободным доступом к

питьевой воде. После 2-недельного карантина здоровые животные использовались в экспериментальной работе.

Методом случайной выборки было сформировано 13 групп по 5 мышей в каждой, из них одна группа контрольная. Первоначально определялась летальная доза (LD_{100}) стафилококка для данной линии мышей конкретной массы тела при внутривенном пути заражения. Учёт за гибелью мышей проводился ежедневно в течение 10 дней. Летальная доза составляла 3×10^7 КОЕ/мышь.

Для определения сравнительной эффективности испытуемых препаратов (полимерной формы джозамицина и субстанции) мышей (в каждой группе по 10 особей) заражали внутривенно *S.aureus* в летальной дозе. Через 30 мин после заражения мышам проводили пероральное введение субстанции джозамицина (в 1% крахмальном геле) или полученного препарата (в виде суспензии после разбавления водой в соотношении 1:5) в 5 дозах каждый. В качестве контроля в опыте присутствовала группа нелеченых, зараженных *S.aureus* животных (в летальной дозе). За животными наблюдали в течение 14 дней, ежедневно фиксировали гибель. После завершения опыта проводили патологоанатомическое вскрытие подопытных животных [22].

Результаты и обсуждение

Экспериментальным путем были определены такие соотношения джозамицина, ПМГК 50/50, D-маннитола, поливинилового спирта и ДМСО, при которых образуется жидкая, однородная, прозрачная и стабильная при комнатных условиях система. Соотношение компонентов полимерной формы подбиралось также с учётом терапев-

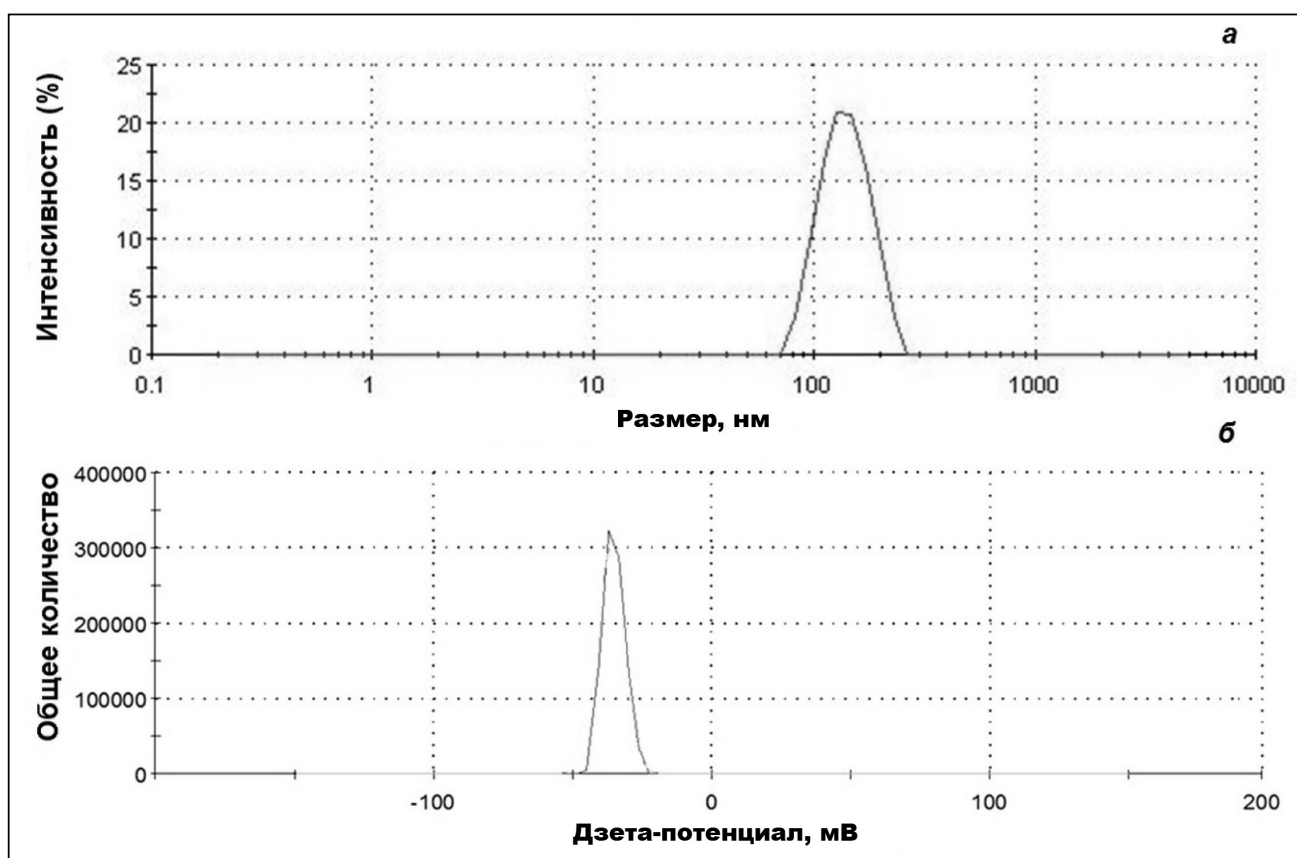


Рис. 2. Размер (а) и дзета-потенциал (б) полимерных частиц с джозамицином.

тической дозы антибиотика. Состав полимерной формы приведён в табл. 1.

При разбавлении полученной полимерной формы водой в соотношении от 1:5 до 1:20 образуется устойчивая опалесцирующая суспензия. В таких концентратах объёмом до 5 мл содержится терапевтическая доза субстанции, необходимая для приёма один раз в сутки. Возможность разбавления средств водой может быть использована для регулировки дозирования препаратов в зависимости от индивидуальных особенностей больного.

Полимерная форма представляла собой частицы с размером около 140 нм (рис. 2, а) и дзета-потенциалом -35 мВ (рис. 2, б).

Действие лизосомальных ферментов позволяет лимфоцитам (или другим клеткам организма, в которых локализуются патогенные микроорганизмы), захватившим частицы полученного размера с противомикробным агентом, разрушить полимерную оболочку частиц и высвободить лекарство. Благодаря этому достигается высокая внутриклеточная концентрация лекарственного вещества [23].

Измерение дзета-потенциала — один из способов прогнозирования стабильности дисперсной системы частиц. Стабильной считается дисперсия, дзета-потенциал которой $>\pm 30$ мВ, так как в этом случае происходит отталкивание частиц друг от друга. Таким образом, полученное значение дзета-потенциала полимерных частиц составило -35 ± 1 мВ, что говорит о стабильности данной дисперсной системы [24].

С целью изучения морфологии и подтверждения размера, полимерные частицы анализировали методом ПЭМ. Полученные данные подтвердили наличие у частиц сферической формы и среднего диаметра около 130–140 нм (рис. 3), что совпадает с результатами метода динамического светорассеяния (рис. 2, а).

Результаты изучения антибактериальной активности *in vitro* полимерной формы джозамицина представлены в табл. 2. По результатам можно сделать вывод, что полученный препарат обладал либо более высокой, либо сходной антибактериальной активностью по сравнению с субстанцией джозамицина в отношении грамположительных, грамотрицательных, а также атипичных бактерий. Более высокая антибактериальная активность по сравнению с субстанцией (в 8 раз) была обнаружена у препарата в отношении *E.faecalis* (см. табл. 2).

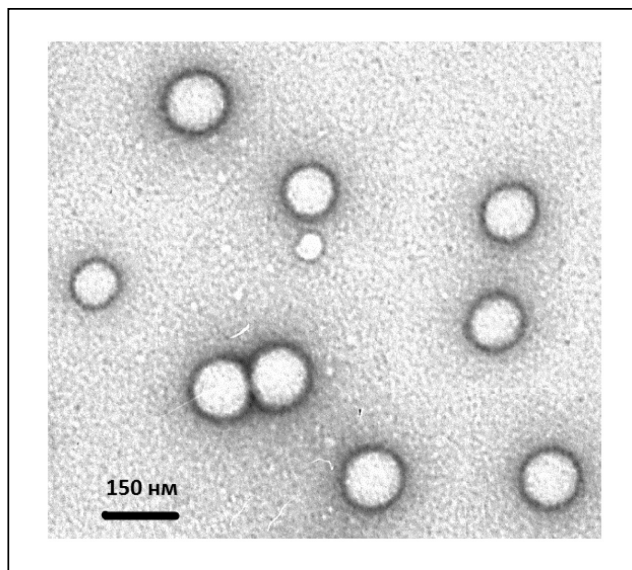


Рис. 3. Микрофотография полимерных частиц, содержащих джозамицин, полученная методом ПЭМ.

Определение специфической активности полимерной формы джозамицина в сравнении с субстанцией на модели стафилококкового сепсиса мышей проводили в 5 дозах: 1, 4, 12, 48 и 100 мг/кг. Длительность эксперимента составляла 14 сут. В то время как полная гибель мышей нелеченого контроля составляла 7 сут, при лечении животных дозой 100 мг/кг наблюдалось полное выздоровление и 100% выживаемость как в группе с субстанцией джозамицина, так и в группе с его полимерной формой. Эффективность на одном уровне была отмечена и для дозы 48 мг/кг для двух препаратов, при этом, выживаемость составила 80% (рис. 4, а).

Результаты эксперимента с применением остальных трёх доз показали увеличение эффективности полимеркапсулированного джозамицина по сравнению с субстанцией при снижении дозы, свидетельствуя об эффективности полимерной формы и пролонгированного действия за счёт постепенного высвобождения препарата из частиц. Тем самым удается добиться поддержания концентрации действующего вещества на необходимом уровне.

При сравнении кривых динамики гибели мышей можно отметить общую закономерность: отличие в гибели животных наступает после 5 сут от начала заражения и введения препаратов, что также можно объяснить кинетикой высвобождения

Таблица 2. Антибактериальная активность полимерной формы джозамицина и субстанции *in vitro*

Препарат	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл				
	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	MRSA ATCC 43300	<i>E.faecalis</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
Джозамицин (субстанция)	4,0±0,1	>128	4,0±0,1	>128	>128
Полимерная форма джозамицина	2,0±0,1	>128	0,5±0,1	>128	>128

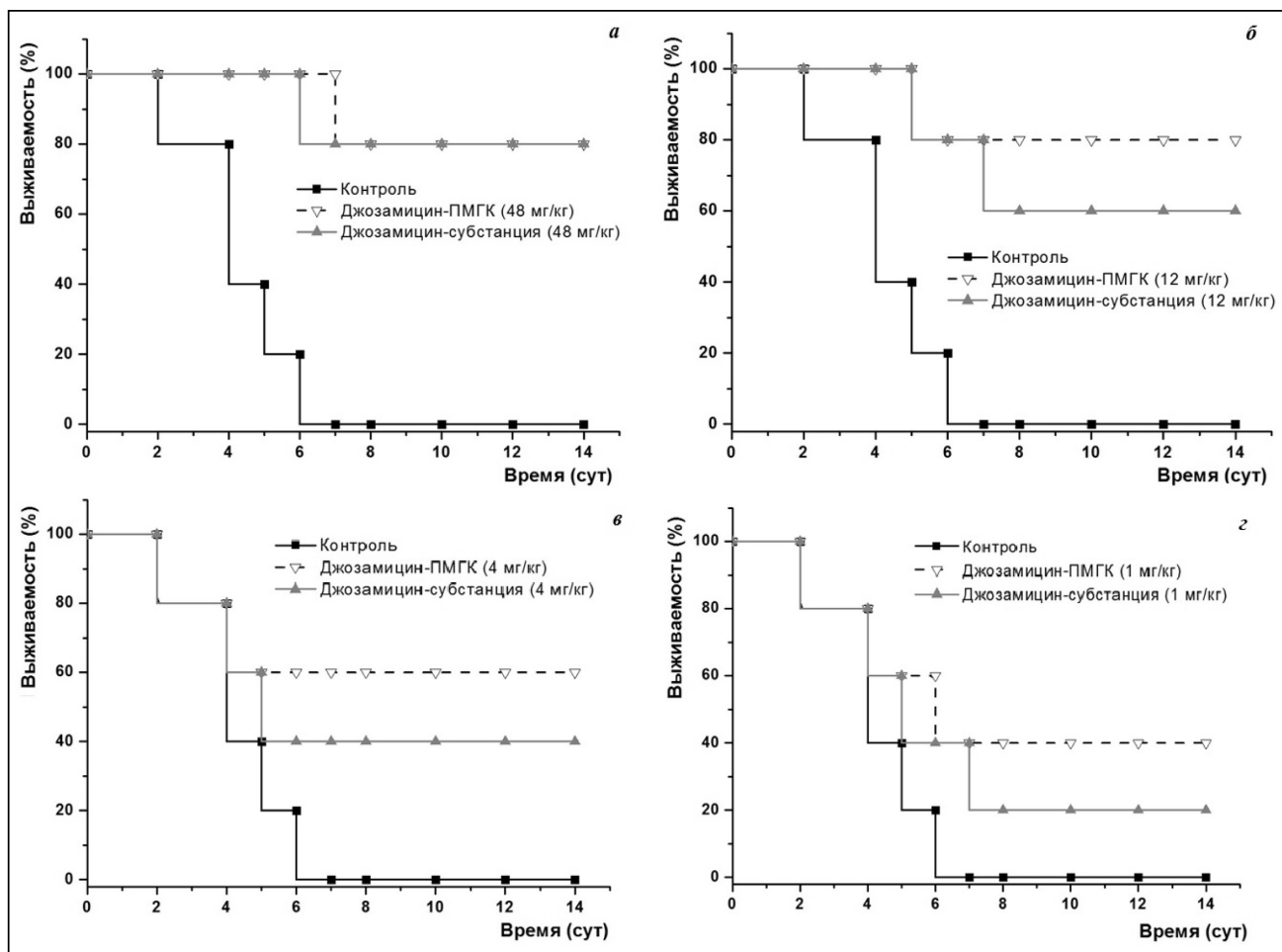


Рис. 4. Динамика гибели мышей, зараженных сепсисом, вызванным *S.aureus* (штамм 10, адаптированный к мышам), при внутривенном способе заражения, после лечения полимерной формой джозамицина в дозах 48, 12, 4 и 1 мг/кг по сравнению с мышами, леченными субстанцией джозамицина в тех же дозах. Препараты вводили однократно перорально через 30 мин после заражения животных.

ния препарата. Отмечена гибель для групп, леченных субстанцией в дозах 1,4 и 12 мг/кг после 5 сут, которая на 20% была больше, чем в группах с теми же дозами, но для полимерного препарата. Отсюда можно сделать вывод о перспективе замены препарата лечения — субстанции джозамицина на его полимерную форму со следующими для групп дозами: 48 мг/кг (субстанция) — на 12 мг/кг (полимерная форма), 12 мг/кг (субстанция) — на 4 мг/кг (полимерная форма), т.е. сокращением дозы в 4 раза с сохранением эффективности действия и процента выживаемости животных (см. рис. 4, б—г). Полученные результаты показывают снижение токсичности и увеличение эффективности полимерного препарата при одновременном снижении дозы.

По результатам эксперимента *in vivo* была определена половина величины действующей дозы ($ЭД_{50}$), которая составляет 5,6 мг/кг для субстанции джозамицина, а для полимерного препарата — 3,5 мг/кг. Таким образом, полимерная форма джозамицина почти в два раза эффективнее субстан-

ции (по значениям $ЭД_{50}$), что также коррелирует с динамикой гибели животных, в результате чего можно вводить дозу в два раза меньшую и наблюдать эффективность действия полимерной формы на том же уровне, но со снижением общей токсичности, а также сокращением кратности приёма.

Полученные результаты исследований специфической активности препаратов *in vivo* на модели стафилококкового сепсиса мышей показали, что исследуемая полимерная форма и субстанция джозамицина проявили выраженную эффективность. Причём эффективность субстанции была практически в 2 раза ниже, чем у полученного полимерного препарата, при этом при патологоанатомическом вскрытии подопытных животных отсутствовали значимые эффекты токсического действия полимерной формы на органы и ткани подопытных животных.

Заключение

Таким образом, предложен технологически простой способ получения полимерной формы

антибиотика джозамицина, обладающего высокой противомикробной активностью широкого спектра действия. При этом наибольшую активность полученный препарат проявлял в отношении *E.faecalis*. Результаты, полученные в эксперименте *in vivo*, показали увеличение эффективности в сравнении с субстанцией джозамицина в два раза. Наличие более высокой противомикробной активности полученного

препарата позволяет снизить величину терапевтической дозы и, следовательно, уменьшить токсическое воздействие антибиотика на организм пациента. Возможность снижения токсических эффектов, а также кратности приёма препарата без потери эффективности действия позволяет высоко оценивать перспективность использования данного препарата в терапии бактериальных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоренко С.В. Резистентность микроорганизмов и антибактериальная терапия. Русск. мед. журн. 1998; 6: 1: 717–725. / *Sidorenko S.V. Rezistentnost' mikroorganizmov i antibakterial'naja terapija. Russk. med. zhurn. 1998; 6: 1: 717–725. [in Russian]*
2. Козлов Р.С. Резистентность к антибактериальным препаратам как реальная угроза национальной безопасности. РМЖ Мед обозрение 2014; 4: 321–323. / *Kozlov R.S. Rezistentnost' k antibakterial'nym preparatam kak real'naja ugroza nacional'noj bezopasnosti. RMZh Med obozrenie 2014; 4: 321–323. [in Russian]*
3. Фанг Джиа-Хва, Сингх Манмохан, О'Хейган Дерек, Хора Маниндер, авторы; Композиции микрокапсул и способы их получения. Патент РФ 2257198, 2005 Июль 27. / *Fang Dzha-Khva, Singkh Manmohan, O'Khajgan Derek, Khora Maninder, avtory; Kompozicii mikrochasticy i sposoby ikh polucheniya. Patent RF 2257198, 2005 Ijul' 27. [in Russian]*
4. Сиджфрид К. Джун. Частицы, включающие плохо растворимое кристаллическое терапевтическое или диагностическое средство и способ их получения. Патент РФ № 2124886, 1999. / *Sidzhfrid K. Dzhun. Chasticy, vkluchajushhie plokhro rastvorimoe kristallicheskoe terapevticheskoe ili diagnosticheskoe sredstvo i sposob ikh polucheniya. Patent RF № 2124886, 1999. [in Russian]*
5. Северин Е.С., Ерохин В.В., Демикова О.В., Сукоян Г.В., Зыкова И.Е., Бочарова И.В. и соавт., авторы; Лекарственное средство пролонгированного действия с дозированным высвобождением в органы-мишени на основе D-циклосерина для лечения резистентных форм туберкулеза. Патент РФ № 2403041, 2010 Ноябрь 10. / *Severin E.S., Erokhin V.V., Demikhova O.V., Sukojan G.V., Zyкова I.E., Bocharova I.V. i soavt., avtory; Lekarstvennoe sredstvo prolongirovannogo dejstvija s dozirovannym vysvobozhdeniem v organy-misheni na osnove D-cikloserina dlia lechenija rezistentnykh form tuberkuleza. Patent RF № 2403041, 2010 Nojabr' 10. [in Russian]*
6. Северин Е.С., Ерохин В.В., Демикова О.В., Барсегян Г.Г., Зыкова И.Е., Бочарова И.В. и соавт. Лекарственное средство пролонгированного действия для лечения резистентных форм туберкулеза на основе рифамицина. Патент РФ № 2418585, 2011 Май 20. / *Severin E.S., Erokhin V.V., Demikhova O.V., Barsagian G.G., Zyкова I.E., Bocharova I.V. i soavt., avtory; Lekarstvennoe sredstvo prolongirovannogo dejstvija dlia lechenija rezistentnykh form tuberkuleza na osnove rifampicina. Patent RF № 2418585, 2011 Maj 20. [in Russian]*
7. Крылов Ю.Ф., гл. редактор. РЛС-Энциклопедия лекарств. Изд. 8-е, перераб. и доп. М.: РЛС-2001; 2000. / *Krylov Ju.F., gl. redaktor. RLS-Jenciklopedija lekarstv. Izd. 8-e, pererab. i dop. M.: RLS-2001; 2000. [in Russian]*
8. Auzou M., Caillon J., Poyart C., Weber P., Ploy M.-C., Leclercq R., Cattoir V. *In vitro* activity of josamycin against *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with upper respiratory tract infections in France. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2015; 45: 7: 293–295.
9. Przybylski P., Pyta K. Transformation of josamycin in alkaline solution — intramolecular SN2 substitution or E1cB elimination and intramolecular Michael addition? *Tetrahedron Letters* 2011; 52: 47: 6275–6280.
10. Zhehui Zh., Longlong J., Yanpeng Xu, Di Zh., Yi Liu, Chao Liu, Pingsheng Lei. Synthesis and antibacterial activity of a series of novel 9-O-acetyl-4'-substituted 16-membered macrolides derived from josamycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24: 2: 480–484.
11. Северин Е.С., Кузнецов С.Л., Помазкова Т.А., Воронцов Е.А., Крюков Л.Н. Лекарственное средство противомикробного действия, способ получения лекарственного препарата направленного действия, содержащего наночастицы. Патент РФ 2327459, 2008. / *Severin E.S., Kuznecov S.L., Pomazkova T.A., Voroncov E.A., Krjukov L.N. Lekarstvennoe sredstvo protivomikrobnogo dejstvija, sposob polucheniya lekarstvennogo preparata napravlennogo dejstvija, sodержashhego nanochasticy. Patent RF 2327459, 2008. [in Russian]*
12. Yu Z.W., Quinn P.J. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci Rep* 1994; 14: 259–281.
13. Собетов Б.Г., Собетова В.Б., Алексеевич Я.И., Озеров Б.Г., Меркулов С.П. Способ получения инъекционной формы дисульфирама. Патент РФ № 2013090, 1994 Май 30. / *Sobetov B.G., Sobetova V.B., Alekseevich Ja.I., Ozerov B.G., Merkulov S.P. Sposob polucheniya in#ekcionnoj formy disul'firam. Patent RF № 2013090, 1994 Maj 30. [in Russian]*
14. Балабанова Р.М., Алябьева А.П., Ахназарова В.Д. и др. Применение диметилсульфоксида в комплексной терапии больных системной склеродермией. Тер Архив 1977; 1: 99–102. / *Balabanova R.M., Aljabeva A.P., Akhnazarova V.D. i dr. Primenenie dimetilsul'foksida v kompleksnoj terapii bol'nykh sistemnoj sklerodermiei. Ter Arkhiv 1977; 1: 99–102. [in Russian]*
15. Бойко Н.Н. Влияние различных концентраций и сочетаний растворов димексидна на течение раневого процесса. Клин Хирургия 1979; 1: 64–65. / *Bojko N.N. Vlijanie razlichnykh koncentracij i sochetanij rastvorov dimeksida na techenie ranevogo processa. Klin Khirurgija 1979; 1: 64–65. [in Russian]*
16. Nikolskaya E., Vorontsov E., Severin E., Gulenko V., Mitrokhin M., Iurchenko M., et al. inventors; Josamycin-based pharmaceutical composition and a process for preparing the same. Patent WO 2015071543 A1, 2015 May 21.
17. Хараева З.Ф., Балахова Б.О., Белимгодова Р.Р., Мустафаев И.М., Тугусева Д.С., Чочуева Н.А. и др. Особенности внутрибольничных штаммов *Staphylococcus aureus*. Фундаментальные исследования 2014; 11–6: 1316–1318. / *Kharaeva Z.F., Balakhova B.O., Belimgotova R.R., Mustafayev I.M., Tugusheva D.S., Chochueva N.A. i dr. Osobennosti vnutribol'nicnykh shtammov Staphylococcus aureus. Fundamental'nye issledovaniya 2014; 11–6: 1316–1318. [in Russian]*
18. Кузнецова М.В., Плотнокова Е.Г., Карпунина Т.И., Горюшиц Э.С., Демаков В.А. Молекулярно-генетические исследования в лабораторной диагностике и мониторинге возбудителей госпитальных инфекций. Пермский мед журнал 2010; 6: 27: 128–138. / *Kuznecova M.V., Plotnikova E.G., Karpunina T.I., Gorovits E.S., Demakov V.A. Molekuljarno-geneticheskie issledovaniya v laboratornoj diagnostike i monitoringe vzbuditelej gospital'nykh infekcij. Permskij med zhurnal 2010; 6: 27: 128–138. [in Russian]*
19. Науменко З.С., Розова Л.В. Устойчивость *Staphylococcus aureus* к антибактериальным препаратам. Гений ортопедии 2007; 2: 36–38. / *Naumenko Z.S., Rozova L.V. Ustojchivost' Staphylococcus aureus k antibakterial'nym preparatam. Genij ortopedii 2007; 2: 36–38. [in Russian]*
20. Warsa U.Ch., Okubo T., Okamoto R. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Indonesia. *Journal of Infection and Chemotherapy* 1996; 2: 1: 29–33.
21. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 04.03.2004 г. / *Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04 «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam». Utverzhdeny i vvedeny v dejstvie Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossijskoj Federacii G.G.Onishhenko 04.03.2004 g. [in Russian]*
22. Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. М.: «Гриф и К»; 2012; 944. / *Rukovodstvom po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv / Pod red. A.N. Mironova. M.: «Grif i K»; 2012; 944. [in Russian]*
23. Найденова А.А., Сукоян Г.В., Воронцов Е.А., Кузнецов С.Л., Гукасова Н.В., Рязцева М.С. и др. Разработка наносомальных композиций рифамицина и d-циклосерина на основе полилактидгликолидов и исследование их противотуберкулезной активности. Нанотехнологии и охрана здоровья 2012; 4: 3 (12): 23–30. / *Najdenova A.A., Sukojan G.V., Voroncov E.A., Kuznecov S.L., Gukasova N.V., Ryabceva M.S. i dr. Razrabotka nanosomal'nykh kompozicij rifampicina i d-cikloserina na osnove polilaktidglikolidov i issledovanie ikh protivotuberkuleznoj aktivnosti. Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ja 2012; 4: 3 (12): 23–30. [in Russian]*
24. Panyam J., Zhou W.-Z., Prabha S., Sahoo S.K., Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB Journal* 2002; 16: 10: 1217–1226.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Никольская Елена Дмитриевна — зав. лабораторией, научно-производственная лаборатория, Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО ВНИЦМДЛ), Москва

Жунина Ольга Александровна — к.б.н., с.н.с., научно-производственная лаборатория, Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО ВНИЦМДЛ), Москва

Сокол Мария Борисовна — инженер-исследователь, научно-производственная лаборатория, Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО ВНИЦМДЛ), Москва

Фомичева Маргарита Викторовна — инженер, отдел по инновационным технологиям и внедрению, Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО ВНИЦМДЛ), Москва

Лукасова Надежда Вадимовна — к.б.н., с.н.с., лаборатория клеточной биологии и молекулярной медицины, отделение системной биологии и биомедицины Курчатова

плекса НБИКС-технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»), Москва

Воронцов Евгений Алексеевич — к.х.н., в.н.с., лаборатория клеточной биологии и молекулярной медицины, отделение системной биологии и биомедицины Курчатова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»), Москва

Яббаров Никита Григорьевич — к.б.н., с.н.с., научно-производственная лаборатория, Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО ВНИЦМДЛ), Москва

Терещенко Оксана Геннадьевна — зав. лабораторией, производственно-технологическая лаборатория, Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО ВНИЦМДЛ), Москва

Северин Евгений Сергеевич — д.х.н., профессор, член-корр. РАН, директор по науке, Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО ВНИЦМДЛ), Москва

Антибактериальные и антимикотические свойства гранулированных углеродных сорбентов, модифицированных олигомерами молочной кислоты

Л. Г. ПЬЯНОВА^{1,2}, В. Т. ДОЛГИХ³, В. А. ЛИХОЛОБОВ^{1,2}, Н. В. РУДАКОВ³,
М. Г. ЧЕСНОКОВА³, А. В. СЕДАНОВА¹

¹ Институт проблем переработки углеводородов СО РАН, Омск

² Омский государственный технический университет МО РФ, Омск

³ Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, Омск

Antibacterial and Antimycotic Properties of Granular Carbon Sorbents Modified With Lactic Acid Oligomers

L. G. P'YANOVA^{1,2}, V. T. DOLGIKH³, V. A. LIKHOLOBOV^{1,2}, N. V. RUDAKOV³, M. G. CHESNOKOVA³, A. V. SEDANOVA¹

¹ Institute of Hydrocarbons Processing SB RAS, Omsk

² Omsk State Technical University, Omsk

³ Omsk State Medical Academy, Omsk

Представлены результаты стендовых микробиологических исследований по определению антибактериальной и антимикотической активности образцов углеродных сорбентов, модифицированных олигомерами молочной кислоты. Установлено, что исследуемые микроорганизмы — *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* проявляют устойчивость к большинству антимикробных препаратов, широко используемых в клинической практике для лечения инфекционных заболеваний бактериальной и грибковой природы. Выявлено антимикотическое действие модифицированных сорбентов в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida* вида *albicans*. Впервые установлено, что модифицированные сорбенты обладают выраженными антимикробными свойствами в отношении ассоциативной бактериально-грибковой культуры *S. aureus* + *C. albicans*, особенно углеродный сорбент, модифицированный 50% раствором молочной кислоты с последующей поликонденсацией.

Ключевые слова: углеродный сорбент, олигомеры молочной кислоты, антибактериальный спектр, антимикотические свойства.

Results of the microbiological bench testing of antibacterial and antimycotic activity of the carbon sorbents modified with lactic acid oligomers are presented. It was found that the studied microorganisms — *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* — are resistant to the majority of antimicrobial preparations that are widely used nowadays in clinical practice for treatment of bacterial and mycotic infectious diseases. Antimycotic effect of the modified sorbents toward yeast-like fungi *Candida albicans* was revealed. It was established for the first time that the modified sorbents have pronounced antimicrobial properties toward associative bacterial-fungal culture *S. aureus* + *C. albicans*, especially the carbon sorbent that was modified with a 50% lactic acid solution with subsequent polycondensation.

Keywords: carbon sorbent, lactic acid oligomers, antibacterial properties, antimycotic properties.

Введение

Нарушение микроэкологии с возрастанием этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов под влиянием антимикробной терапии нередко сопровождается развитием резистентности возбудителей инфекционных заболеваний к антибактериальным и антимикотическим препаратам. В связи с этим научные

поисковые исследования по разработке новых соединений и методов лечения заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, представляются актуальными [1, 2]. Перспективным методом является сорбционная терапия с использованием материалов, которые безопасны для организма и не содержат антибиотиков или антимикотиков. Они инактивируют патогенные микроорганизмы и выводят из макроорганизма продукты их жизнедеятельности, а также продукты нарушенного метаболизма и токсичные соединения, полученные из внеш-

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 644099, Омск-99, ул. Ленина, 12. Омский государственный медицинский университет. E-mail: prof_dolgi@mail.ru

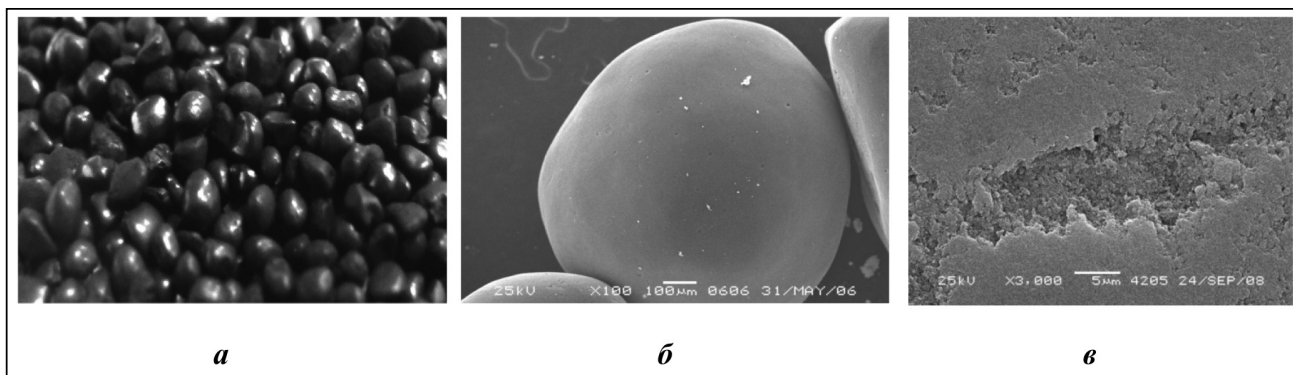


Рис. 1. Гранулы углеродного гемосорбента ВНИИТУ-1.

а — вид гранул образца 1 (немодифицированный); *б* — снимок гранула под электронным сканирующим микроскопом при увеличении $\times 100$; *в* — поверхность гранулы под электронным сканирующим микроскопом при увеличении $\times 3000$.

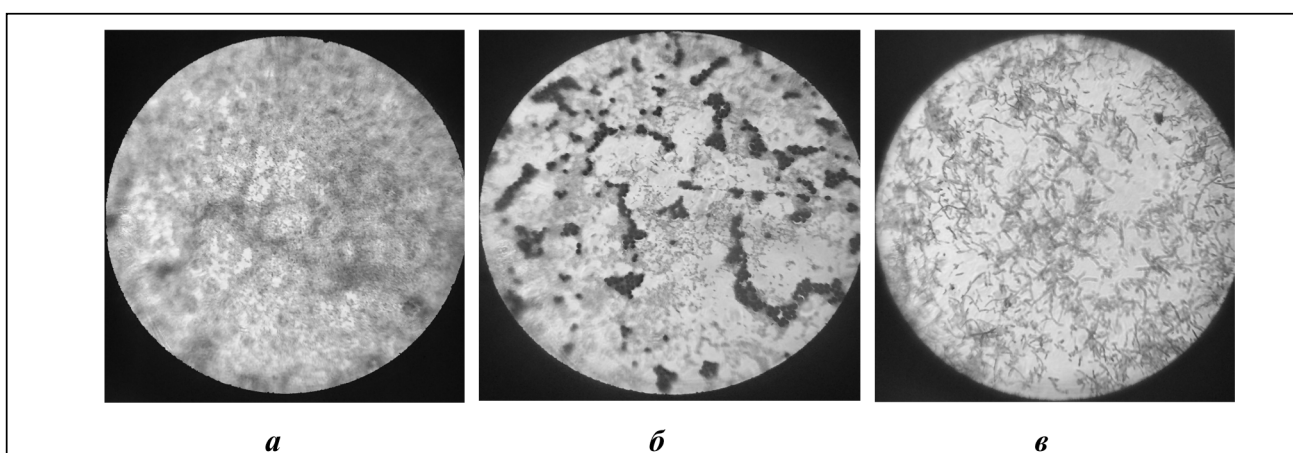


Рис. 2. Морфологические формы микроорганизмов.

а — *Escherichia coli*; *б* — *Candida albicans*; *в* — *Pseudomonas aeruginosa*. Увеличение $\times 900$.

ней среды [3]. Известно, что гидроксикислоты (молочная, гликолевая и их олигомеры) проявляют антибактериальные свойства, подавляя рост патогенных микроорганизмов [4—6]. Лечебное действие углеродных сорбционных материалов объясняется их сорбционно-адгезивными свойствами [7, 8]. В Институте проблем переработки углеводов СО РАН (ИППУ СО РАН) разработаны гранулированные углеродные сорбенты, модифицированные олигомерами гидроксикислот, в том числе молочной кислоты [9].

Цель настоящей работы — исследовать антибактериальное и антимикотическое действие образцов углеродных сорбентов в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Материал и методы

Материалом для создания модифицированного сорбента послужил гранулированный гемосорбент ВНИИТУ-1 (образец № 1), разработанный в ИППУ СО РАН на основе нанодисперсного углерода (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03492 от 25.09.2012 г.). Образец № 1 — это углеродный сорбент, обработанный гидромеханически, окислен и стабилизирован до нормативных значений pH. Он представляет со-

бой сферические гранулы чёрного или серебристого цвета диаметром 0,63—1,00 мм без вкуса и запаха, характеризуется высокой химической чистотой (содержание углерода не менее 99,5%), практически полным отсутствием пылевидных частиц на поверхности и в порах (содержание минеральных примесей менее 0,15%, общей серы — не более 0,30%) и совместим с биологическими жидкостями. Образец № 2 — это углеродный сорбент, модифицированный 20% раствором молочной кислоты с последующей поликонденсацией. Образец № 3 — углеродный гранулированный сорбент, модифицированный 50% раствором молочной кислоты с последующей поликонденсацией и образец № 4 — углеродный гранулированный сорбент, модифицированный 80% раствором молочной кислоты с последующей поликонденсацией. Вид гранул углеродного сорбента ВНИИТУ-1 (до модифицирования) и поверхность гранул представлены на рис. 1.

Предварительно патогенные и условно-патогенные микроорганизмы исследовали на чувствительность к антибиотикам (диски с антибиотиками компании Becton Dickinson and Company USA, производство Ireland, Benex, Limited). Используются следующие тест-штаммы ATCC, полученные из ГИСК им. Л. А. Тарасевича: грамположительный патогенный *Staphylococcus aureus*, грамположительные условно-патогенные микроорганизмы *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также клинические штаммы: *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Морфологические формы исследованных микроорганизмов характеризовались разнообразием (рис. 2).

Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием тест-систем производства PLIVA — Lachema Diagnostica (Чехия) в компьютерной программе «МИКРОБ Автомат». Антимикотические свойства сорбентов исследовали в отношении клинического штамма *Candida albicans*. Изучение активности действия углеродных сорбентов в отношении к бактериально-грибковой ассоциации проводили с использованием смешанной культуры *S.aureus* + *C.albicans*.

Оценку чувствительности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в отношении углеродных сорбционных материалов проводили с помощью диско-диффузионного метода. Суточную культуру соответствующего тест-микроорганизма, выращенную на скошенном 2% агаре Мюллера—Хинтон (ЗАО НИЦФ, Россия), смывали 5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия; полученную суспензию микробов разводили физиологическим раствором до концентрации 1 млрд микробных тел в 1 мл по бактериальному стандарту мутности.

Перед началом исследований проводили стерилизацию гранулированных углеродных сорбентов в микробиологическом боксе БОВ-001-АМС СЛШ-М (ЗАО «Миасский завод», РФ) ультрафиолетовыми лучами с помощью ртутно-кварцевой лампы (ООО «СибЭСТ», РФ) в течение 30 мин. В качестве контроля использовали немодифицированный гранулированный углеродный сорбент — образец № 1, который стерилизовали при 1 атм в течение 30 мин. Образцы сорбентов после стерилизации помещали в стерильные чашки Петри (ОАО «Медполимер», РФ).

Для тест-микроорганизмов в качестве питательной среды использовали 2% агар Мюллера—Хинтон (рН 7,2—7,4), который разливали в чашки Петри диаметром 90 мм в количестве 20 мл. Для микроорганизмов рода *Streptococcus* в качестве питательной среды использовали агар Мюллера—Хинтон с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови. Дефибринированную кровь вносили асептически в питательную основу после автоклавирования и охлаждения до 48—50°C.

В соответствии с правилами микробиологической техники на поверхность плотной агаровой среды в чашки Петри стерильной пипеткой наносили 1 мл суспензии суточной культуры микроорганизма в концентрации, эквивалентной стандарту мутности 0,5 по McFarland (содержание микроорга-

низмов $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), равномерно распределяли по поверхности среды покачиванием, после чего удаляли избыток инокулюма пипеткой. После 30-минутного подсушивания чашек Петри в термостате при 37°C на поверхность среды, засеянную микроорганизмами, проводили аппликацию четырёх образцов гранулированных сорбентов с помощью пинцета на участке диаметром 10 мм каждый на расстоянии не менее 20 мм друг от друга. С каждой культурой использовали по три чашки.

После аппликации сорбентов чашки Петри с дисками выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем помещали в термостат сверху дном и инкубировали при температуре +37°C в течение 18—24 ч, в зависимости от вида тестируемого микроорганизма. После окончания инкубации проводили учёт результатов, измеряя диаметр зоны задержки роста микробов с точностью до 1 мм, учитывая диаметр участка нанесения гранул (10 мм). По величине зоны угнетения роста тест-микробов судили об антибактериальных свойствах гранулированных углеродных сорбентов.

Оценку антимикотических свойств сорбентов проводили по аналогичной методике. Готовили взвесь культуры дрожжеподобных грибов *C.albicans* в изотоническом растворе хлорида натрия, содержащую $5,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. В качестве питательной среды использовали агаризованную среду Сабуро. После нанесения сорбентов на засеянную питательную среду чашки выдерживали 30 мин при комнатной температуре, помещали в холодильник при температуре 10°C на 2 ч, после чего перенесли в термостат для инкубации в течение 24—48 ч при 30°C.

Для оценки антибактериальной активности сорбентов в каждом случае измеряли диаметр зоны задержки (подавления) роста микроорганизмов. В случаях, если диаметр зоны задержки роста микробов составлял от 10 до 15 мм, считали, что сорбент проявляет слабое антибактериальное (антимикотическое) действие. Если диаметр зоны подавления роста составлял от 15 до 20 мм, то считали, что сорбент обладает умеренно выраженным действием. При диаметре зоны подавления роста более 20 мм считали, что сорбент проявляет сильно выраженные биоспецифические свойства. Отсутствие зоны задержки роста микробов вокруг дисков свидетельствовало об отсутствии у сорбентов антибактериальных или антимикотических свойств.

Таблица 1. Чувствительность условно-патогенных и патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам

Антимикробные препараты	Исследуемые штаммы микроорганизмов							
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.coli</i>
Бензилпенициллин	R	R	S	S	R	R	R	R
Ампициллин	R	R	S	S	S	R	R	R
Оксациллин	R	R	R	R	R	R	R	R
Гентамицин	S	S	R	R	R	S	S	S
Эритромицин	R	S	S	S/R	S	R	R	R
Левомецетин	R	S	S	S	R	R	S	S
Ципрофлоксацин	R	S	S/R	R	R	S	S	S
Офлоксацин	R	S	R	R	R	R	S	S
Норфлоксацин	R	R	R	R	R	R	S	S
Доксициклин	S	S	R	R	R	R	S	S
Тетрациклин	R	S	R	R	R	R	S	S
Цефалотин	S	S	R	S	R	R	R	S
Цефазолин	S	S	S	S	R	R	S	S
Цефалексин	S	S	S	S	R	R	S	S
Цефоперазон	R	R	S	S	R	R	S	S
Цефотаксим	R	R	R	R	R	S	S	S
Цефтриаксон	R	R	R	R	R	S	S	S
Цефтазидим	R	R	R	R	R	S	R	S
Цефутоксим	R	S	S	S	R	R	R	R

Примечание. S — микроорганизм чувствителен к препарату; R — микроорганизм проявляет устойчивость (резистентность) к препарату; S/R — микроорганизм проявляет умеренную устойчивость к препарату.

Результаты и обсуждение

Чувствительность условно-патогенных и патогенных микроорганизмов оценивали в отношении 19 антимикробных препаратов. Интерпретацию результатов проводили согласно методическим указаниям [9]. Результаты этих исследований представлены в табл. 1.

Анализ полученных результатов исследований показал, что *S.aureus* был устойчив к 14 препаратам, *S.epidermidis* — к 8, штаммы *S.pyogenes* и *S.agalactiae* — к 10 препаратам, *E.faecalis* — к 17, *P.aeruginosa* — к 14, *K.pneumoniae* — к 7 препаратам и *E.coli* — только к 5 препаратам. Изучение чувствительности *C.albicans* проводили в отношении 6 антимикотических препаратов. Результаты этих исследований представлены в табл. 2. Согласно полученным результатам штамм *C.albicans* оказался устойчивым к нистатину и амфотерицину В.

Таким образом, установлено, что исследованные микроорганизмы устойчивы к большинству препаратов, широко используемых в настоящее время в клинической практике для лечения инфекционных заболеваний бактериальной и грибковой природы. Полученные результаты исследований подтверждают существующую статистику о том, что резистентность возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам достаточно высока. Необходимо учитывать и тот факт, что большинство антибактериальных пре-

паратов негативно влияют на микробиоценоз человека, увеличивают долю антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, оказывают побочное действие на организм. Полученные результаты подчеркивают актуальность поиска новых подходов и соединений, отличающиеся по механизму действия от антибиотиков, обладающих высокой антибактериальной и антимикотической активностью.

Результаты изучения активности гранулированных углеродных сорбентов в отношении условно-патогенных и патогенных бактериальных культур по отмечающейся диффузии в агаре (зона задержки роста, мм) представлены в табл. 3.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии антибактериальной активности у образца сорбента №1 углеродного сорбента. Образец №2 обладал слабо выраженным антибактериальным действием по отношению ко всем использованным штаммам. Образцы №3 и №4 проявляли умеренно выраженную активность в отношении тест-штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *E.faecalis* и *P.aeruginosa*, при этом они проявляли слабо выраженное действие в отношении штаммов *K.pneumoniae* и *E.coli*.

Образец №4 обладал наиболее выраженной антибактериальной активностью в сравнении с образцом №3 в отношении штаммов *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *E.faecalis*, являющихся представителями родов *Streptococcus* и *Enterococcus*. Проявление

Таблица 2. Чувствительность дрожжеподобных грибов *C.albicans* к антимикотическим препаратам

Антимикотический препарат	Степень чувствительности
Нистатин	R
Амфотерицин В	R
Клотримазол	S
Флуконазол	S
Кетоконазол	S
Итраконазол	S

Примечание. S — микроорганизм чувствителен к препарату; R — микроорганизм проявляет устойчивость (резистентность) к препарату.

Таблица 3. Оценка чувствительности патогенной и условно-патогенной микрофлоры к исследуемым сорбентам при применении метода диффузии в агар

Исследуемые культуры	Образцы сорбента			
	№1	№2	№3	№4
<i>S.aureus</i>	—	*	**	**
<i>S.epidermidis</i>	—	*	**	**
<i>S.pyogenes</i>	—	*	**	**
<i>S.agalactiae</i>	—	*	**	**
<i>E.faecalis</i>	—	*	**	**
<i>P.aeruginosa</i>	—	*	*	*
<i>K.pneumoniae</i>	—	*	*	*
<i>E.coli</i>	—	*	*	*

Примечание. Здесь и в табл. 4: * — диаметр зоны задержки роста микробов (зона действия сорбента) от 10 до 15 мм (слабое антибактериальное действие сорбента); ** — диаметр зоны подавления роста от 15 до 20 мм (умеренно выраженное антибактериальное действие сорбента); *** — диаметр зоны подавления роста более 20 мм (сильно выраженные биоспецифические свойства сорбента); «—» — отсутствие зоны задержки роста микробов вокруг дисков (отсутствие у сорбентов антибактериальных свойств).

Таблица 4. Оценка чувствительности дрожжеподобных грибов рода *Candida albicans* и ассоциативной культуры (*S.aureus* + *C.albicans*) в отношении исследуемых сорбентов методом диффузии в агар

Исследуемые культуры	Образцы сорбента			
	№1	№2	№3	№4
<i>C.albicans</i>	—	**	***	***
<i>S.aureus</i> + <i>C.albicans</i>	—	**	***	***

ние данных антибактериальных свойств может быть связано с биологически активными свойствами молочной кислоты, используемой для модифицирования сорбента и выбранных для синтеза концентраций. Впервые было выявлено ингибирующее действие сорбентов в отношении *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *E.faecalis*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.coli*.

Проведены микологические исследования по оценке биоспецифических свойств углеродных сорбентов в отношении тест-культуры дрожжеподобного гриба рода *Candida*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что образец №1 не проявлял антимикотических (противогрибковых) свойств, что выражалось в отсутствии зоны задержки роста дрожжеподобного гриба. Вместе с тем, исследуемые образцы №2, №3 и №4 обладают выраженными антимикотическими свойствами в отношении тест-штаммов *C.albicans* (табл. 4). Наиболее высокая степень антимикотического действия выявлена у сорбента №3, который дал наибольшую зону задержки роста — 25 мм. Образец №2 проявлял умеренно выраженное антимикотическое действие (зона задержки роста 20 мм).

Согласно результатам проведенных испытаний установлено, что модифицированные сорбенты в отличие от немодифицированного образца №1 обладают выраженными антимикробными свойствами по отношению к ассоциативной бактериально-грибковой культуре *S.aureus* + *C.albicans* (см. табл. 4).

Образец №2 проявлял слабую активность в отношении бактериально-грибковой ассоциации (диаметр зоны задержки роста культуры 12 мм). Образцы сорбентов №3 и №4 проявляли достаточно сильно выраженную антибактериальную и антимикотическую активность в отношении исследуемой ассоциации и сформировали зоны задержки роста культуры диаметром 24 и 20 мм. Следует отметить наиболее выраженный эффект действия образца №3.

Высокие антибактериальные и антимикотические свойства модифицированных образцов углеродного сорбента могут быть обусловлены кислотнo-основными свойствами нанесённого олигомера молочной кислоты: при контакте оли-

гомера с биологической средой снижается pH. Происходит локальное «закисление» среды за счёт процесса гидролиза образованного на сорбенте олигомера гидроксикислоты, что является губительным фактором для жизнедеятельности патогенных микроорганизмов.

Таким образом, исследуемые образцы представляют интерес для сорбционной терапии и могут быть рекомендованы для профилактики и лечения гинекологических, стоматологических, гастроэнтерологических заболеваний с целью коррекции микрoэкологических нарушений. Актуальность проведения экспериментальных бактериологических и микологических исследований по оценке биоспецифического действия углеродных сорбентов, модифицированных 50%, 80% раствором молочной кислоты, подтверждает высокий удельный вес оппортунистических инфекций, вызванных бактериально-грибковыми ассоциациями, в которых потенциал патогенности бактериального возбудителя усиливается биопотенциалом дрожжеподобных грибов рода *Candida*, колонизирующих слизистую оболочку биотопов организма человека.

Выводы

1. Установлено, что исследованные микроорганизмы проявляли устойчивость к большинству препаратов, широко используемых в настоящее время в клинической практике для лечения инфекционных заболеваний бактериальной и грибковой природы.

2. Впервые было выявлено антимикотическое действие у модифицированных сорбентов в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida albicans*, а также определена различная степень антимикотического действия исследуемых углеродных сорбентов.

3. Впервые установлено, что модифицированные сорбенты обладают выраженными антимикробными свойствами в отношении ассоциативной бактериально-грибковой культуры *S.aureus* + *C.albicans*. Следует отметить наиболее выраженный эффект на ассоциативную бактериально-грибковую флору сорбента №3, полученного модифицированием 50% раствором молочной кислоты с последующей поликонденсацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самсонов К.В. Сравнительная эффективность сорбции бактерий и бактериальных токсинов углеродными и углерод-минеральными

сорбентами. Бюллетень физиологии и патологии дыхания 2008; 296 48—50. / Samsonov K.V. Sravnitel'naja jeffektivnost' sorbcii bakterij i bakterial'nykh toksinov uglerodnymi i uglerod-mineral'nymi sorbentami. Bjulleten' fiziologii i patologii dykhanija 2008; 296 48—50. [in Russian]

2. Belik E.V., Brykalov A.V., Bostanova F.A. et al. Fabrication and study of biologically active organosilica polymer composites used for application sorption. *Fibre Chemistry* 2008; 40 (5): 445–446. <http://dx.doi.org/10.1007/s10692-009-9080-7>
3. Долгих В.Т., Пьянова Л.Г., Баринов С.В. и др. Эффективность использования углеродного формованного сорбента ВНИИТУ-1 в акушерской практике. *Общая реаниматология* 2015; 11(4): 61–72. / *Dolgikh V.T., Pjanova L.G., Barinov S.V. i dr. Jeffektivnost' ispol'zovanija uglerodnogo formovannogo sorbenta VNIITU-1 v akusherskoj praktike. Obshhaja reanimatologija* 2015; 11(4): 61–72. [in Russian]
4. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. Электронный ресурс: [<http://www.who.int/entity/drugresistance/publications/infographic-antimicrobial-resistance-20140430.pdf>]
5. Antimicrobial resistance threats in the United States. 2013. Электронный ресурс: [www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf].
6. Долгих В.Т., Долгих Т.И., Пьянова Л.Г. и др. Антимикробная активность гранулированных углеродных сорбентов. *Российский иммунологический журнал* 2014; 8 (17), 3: 788–791. / *Dolgikh V.T., Dolgikh T.I., Pjanova L.G. i dr. Antimikrobnaja aktivnost' granulirovannykh uglerodnykh sorbentov. Rossijskij immunologicheskij zhurnal* 2014; 8 (17), 3: 788–791. [in Russian]
7. Бакланова О.Н., Пьянова Л.Г., Талзи В.П. и др. Модифицирование поверхности углеродного сорбента поли-N-винилпирролидоном для аппликационной медицины. *Физикохимия поверхности и защита материалов* 2012; 48 (4): 363–369. / *Baklanova O.N., Pjanova L.G., Talzi V.P. i dr. Modificirovanie poverkhnosti uglerodnogo sorbenta poli-N-vinilpirrolidonom dlja aplikacionnoj mediciny. Fizikokhimija poverkhnosti i zashhita materialov* 2012; 48 (4): 363–369 [in Russian]
8. Пьянова Л.Г., Бакланова О.Н., Лихолобов В.А. и др. Исследование эффекта модифицирования поверхности углеродных сорбентов поли-N-винилпирролидоном комплексом физико-химических и микробиологических методов. *Физикохимия поверхности и защита материалов* 2013; 49(4): 408–417. / *Pjanova L.G., Baklanova O.N., Likholobov V.A. i dr. Issledovanie jeffekta modificirovanija poverkhnosti uglerodnykh sorbentov poli-N-vinilpirrolidonom kompleksom fiziko-khimicheskikh i mikrobiologicheskikh metodov. Fizikokhimija poverkhnosti i zashhita materialov* 2013; 49(4): 408–417. [in Russian]
9. Баринов С.В., Долгих В.Т., Долгих Т.И. и др. Разработка и применение формованных углеродных сорбентов при лечении хронического эндометрита. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)* 2014; 4: 55–59. / *Barinov S.V., Dolgikh V.T., Dolgikh T.I. i dr. Razrabotka i primenenie formovannykh uglerodnykh sorbentov pri lechenii khronicheskogo jendometri-ta. Sibirskij medicinskij zhurnal (Irkutsk)* 2014; 4: 55–59. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Пьянова Лидия Георгиевна — к.б.н., старший научный сотрудник Института проблем переработки углеводородов СО РАН, Омск; доцент кафедры Нефтехимического института Омского государственного технического университета «Химическая технология и биотехнология», Омск

Долгих Владимир Терентьевич — заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии, клинической патофизиологии Омского государственного медицинского университета, Омск

Лихолобов Владимир Александрович — член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор, научный руководитель, Институт проблем переработки углеводородов СО РАН, Омск; заве-

дующий кафедрой Нефтехимического института Омского государственного технического университета «Химическая технология и биотехнология», Омск

Рудаков Николай Викторович — д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Омского государственного медицинского университета, Омск

Чеснокова Марина Геннадьевна — д.м.н., профессор; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Омского государственного медицинского университета, Омск

Седанова Анна Викторовна — к.х.н., старший научный сотрудник Института проблем переработки углеводородов СО РАН, Омск

Экспериментальная оценка влияния препарата Кагоцел на репродуктивную функцию при его введении профилактическими курсами в течение периода полового созревания

Т. Г. БОРОВСКАЯ, В. А. МАШАНОВА

НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск

Experimental Evaluation of the Effect of Kagocel on Reproductive Function When Administered in Prophylactic Courses During the Period of Puberty

T. G. BOROVSKAYA, V. A. MASHANOVA

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk

Данное исследование посвящено экспериментальному изучению репродуктивной безопасности использования трёх последовательных курсов препарата Кагоцел крысам (самцам, самкам) в течение периода полового созревания (с 10-го дня по 45-й день жизни). Препарат вводили в терапевтической дозе (ТД) и в дозе, превышающей таковую в 10 раз (10ТД). По достижении животными половозрелого возраста производилось спаривание крыс экспериментальных групп с интактными партнерами и друг с другом. Для оценки репродуктивной безопасности определяли индекс фертильности, показатели эмбриональной гибели. В антенатальном периоде развития на 20-й день беременности определяли массу, размер плодов, распределение по полу, оценивали состояние их внутренних органов (методом Вильсона) и состояние процессов оксификации (методом Доусона). В постнатальном периоде оценивали индекс выживаемости, динамику массы тела. Результаты исследования показали, что все исследуемые параметры не отличались от таковых в контрольной группе (плацебо, $p < 0.017$). Полученные данные свидетельствуют о репродуктивной безопасности использования профилактических курсов субстанции Кагоцела в течение всего периода полового созревания.

Ключевые слова: Кагоцел, профилактика, половозрелые крысы, репродуктивная токсичность.

This article focuses on the experimental study of reproductive safety of three sequential courses of Kagocel introduced to rats (males, females) during the period of puberty (from the 10th day to the 45th day of life). The drug was administered in a therapeutic dose (TD) and at a dose exceeding that by 10 times (10TD). When the animals reached the mature age, the rats of the experimental groups were mated with intact partners and with each other. To assess reproductive safety, the fertility index and the embryonic death rates were determined. In the antenatal period of development the weight, the size of the fetuses, sex distribution, the status of their internal organs (Wilson method), and the state of the ossification processes (Dawson method) were determined on the 20th day of pregnancy. The survival index and body mass dynamics were evaluated in the postnatal period. The results of the study showed that all investigated parameters did not differ from those in the control group (placebo, $P < 0.017$). The received data testify to reproductive safety of prophylactic courses of Kagocel used during all period of puberty.

Keywords: Kagocel, prophylaxis, juvenile rats, reproductive toxicity.

Введение

Противовирусные препараты относятся к числу самых востребованных лекарственных средств. Это, во многом, связано с тем, что на долю вирусной патологии приходится до 90% всех инфекционных заболеваний [1]. Снижение инфекционной заболеваемости рассматривается в настоящее время как приоритетное направление политики государства в сфере здравоохранения [2]. Дети являются наиболее уязвимой группой населения.

Заболеваемость у них в 3 раза выше, чем у взрослых. Считается, что дети, особенно раннего возраста, характеризуются незрелостью собственных иммунных механизмов. Способность иммунокомпетентных клеток к синтезу ИНФ-альфа в ответ на проникновение вируса у детей снижена в 10 раз по сравнению со взрослыми [3]. Это и определяет предрасположенность детского организма к частым вирусным инфекциям. Количество часто болеющих детей может достигать 80% от детского населения.

Кагоцел является отечественным препаратом, оказывающим противовирусное действие за счёт индукции, так называемого, «позднего» интерферона (ИФН), являющегося смесью ИФН-альфа и

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 634028 Томск, пр. Ленина, 3. НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга. E-mail: repropharm@yandex.ru

ИФН-бета. Препарат вызывает продукцию ИФН практически во всех популяциях клеток, принимающих участие в противовирусной защите организма (Т-В-лимфоцитах, гранулоцитах, макрофагах, фибробластах, эндотелиальных клетках). Кагоцел показал себя, как эффективное и наиболее востребованное лекарственное средство для лечения ОРВИ, гриппа, герпеса. В рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях показано, что он является эффективным лекарственным средством при лечении гриппа и других ОРВИ у детей [3].

Кагоцел представляет собой высокомолекулярное соединение, синтезированное на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и низкомолекулярного природного полифенола (госсиопола), получаемого из растительного сырья (хлопчатника). В многочисленных исследованиях, проводимых в различных странах мира, было доказано, что госсипол проявляет противоопухолевую, антиоксидантную, иммуномодулирующую активность. Данные литературы свидетельствуют о том, что госсипол в свободном виде в определённых дозах способен подавлять сперматогенез у разных видов животных [4, 5]. В то же время, было доказано, что в результате молекулярных сшивок с полимерными носителями госсипол утрачивает свои токсические свойства, при этом сохраняется противовирусная и иммуномодулирующая активности [6]. В основу технологии получения субстанции препарата Кагоцел заложен именно такой приём. Ковалентное связывание молекулы госсипола с карбоксиметилцеллюлозой — макромолекулой, традиционно применяемой в пищевой и медицинской промышленности, позволило создать эффективный и безопасный лекарственный препарат. Кагоцел®, является высокомолекулярным соединением, в силу чего он практически не проникает через гистогематические барьеры, в частности, через гематотестикулярный.

При доклинических исследованиях репродуктивной токсичности Кагоцела установлено, что он

не вызывает угнетения сперматогенеза, снижения плодовитости крыс-самцов репродуктивного возраста и не оказывает отрицательного влияния на их потомство [7]. Данные литературы свидетельствуют о том, что Кагоцел при длительном (48 дней, что соответствует продолжительности всего цикла сперматогенеза) введении в дозах ТД и 10 ТД крысам популяции Вистар не снижает способность животных к спариванию и оплодотворению, не угнетает сперматогенез, не оказывает токсического действия на потомство [8]. Полученные данные характеризуют Кагоцел как препарат с широким профилем репродуктивной безопасности и свидетельствуют о том, что он может быть использован в педиатрической практике.

Не вызывает сомнения тот факт, что любое заболевание, тем более вирусное, легче предупредить, чем лечить. В настоящее время установлено, что Кагоцел является эффективным профилактическим средством вирусных инфекций у детей, обладая способностью компенсировать возрастную незрелость противовирусной защиты организма. Поскольку препарат эффективен для лечения гриппа и ОРВИ у детей и разрешён для его использования в детском возрасте, то важной является оценка его репродуктивной безопасности при использовании в осенне-весенний период регулярными профилактическими курсами у категории часто болеющих детей.

Цель исследования — экспериментальная оценка репродуктивной безопасности Кагоцела при его использовании в период полового созревания регулярными повторяющимися курсами.

Материал и методы

В исследовании использовали препарат Кагоцел, таблетки 12 мг (производственная серия 814/15). Эксперименты проведены на 255 белых аутбредных крысах-самцах и самках популяции Вистар, из них 165 животных в возрасте 10 дней, 90 крыс (для спаривания) в возрасте 77 дней. Распределение животных по группам представлено в табл. 1.

Животные с 10-дневного возраста (по 20 самцов и 45 самок) получали Кагоцел в дозах 6 мг/кг (эквивалентная — ТД)

Таблица 1. Распределение животных по группам.

Самцы, количество, возраст	Самки, количество, возраст
Кагоцел 60 мг/кг	
10 ♂, 10 дней, с дальнейшей гистологией	20 ♀, 11 недель (интактные)
10 ♂, 11 недель (интактные самцы)	20 ♀, 10 дней
10 ♂, 10 дней	20 ♀, 10 дней
—	5 ♀, 10 дней. Эвтаназия на гистологию
Кагоцел 6 мг/кг	
10 ♂, 10 дней, с дальнейшей гистологией	20 ♀, 11 недель (интактные)
10 ♂, 10 дней	20 ♀, 10 дней
10 ♂, 11 недель	20 ♀, 10 дней
—	5 ♀, 10 дней. Эвтаназия для гистологии
Плацебо 440 мг/кг	
10 ♂, 10 дней с дальнейшей гистологией	20 ♀, 11 недель (интактные)
10 ♂, 11 недель	20 ♀, 10 дней
—	5 ♀, 10 дней. Эвтаназия на гистологию
Итого: 80 ♂, из них 30 половозрелых, 50 — подсосного возраста	Итого: 175 ♀, из них 60 половозрелых, 115 — подсосного возраста

Таблица 2. Показатели репродуктивной функции крыс, получавших Кагоцел профилактическими курсами в неполовозрелом возрасте

Группы\Показатели	Интактные самки, спаренные с самцами, получавшими препарат			Самки, получавшие препарат, спаренные с интактными самцами			Самки, получавшие препарат, спаренные с самцами, подвергнутыми такому же воздействию		
	Кагоцел		Плацебо	Кагоцел		Плацебо	Кагоцел		Обобщенный*
	60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг	Плацебо	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг	Плацебо	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг	контроль
Количество самок	5	6	7	7	7	7	4	6	14
Фертильность, %	45	55	65	60	65	65	40	60	65
Количество желтых тел, абс	14,60±0,51	14,57±0,43	14,78±0,55	14,57±0,95	14,43±0,72	14,14±0,86	14,50±0,65	14,33±0,49	14,43±0,50
Количество мест имплантации, абс	12,60±0,68	13,29±0,81	13,57±0,97	13,57±0,97	13,00±0,58	13,00±1,02	12,50±0,50	12,67±0,61	13,36±0,66
Количество живых плодов, абс	11,80±0,37	12,43±0,84	12,57±0,97	12,43±0,84	12,00±0,72	12,29±1,23	11,00±1,08	11,67±0,84	12,43±0,75
Преимплантационная смертность, %	13,51±4,48	9,28±3,14	8,31±4,07	6,84±3,15	7,27±2,68	7,23±3,02	15,70±6,29	11,62±3,06	7,77±2,44
Постимплантационная смертность, %	5,74±3,53	7,53±2,21	7,44±3,03	7,50±4,27	7,20±2,67	7,49±4,28	10,80±4,20	8,28±3,77	7,46±2,52
Размер плодов, мм	28,04±0,05	28,09±0,17	27,65±0,16	27,51±0,29	28,24±0,16	27,95±0,24	27,68±0,26	27,97±0,09	27,80±0,14
Масса плодов, г	2,20±0,03	2,17±0,04	2,04±0,05	2,04±0,06	2,07±0,04	2,09±0,04	2,00±0,05	2,10±0,05	2,06±0,03
Количество плодов с наружными кровоизлияниями, %	4,58±1,91	11,20±2,21	7,36±2,35	5,96±1,90	8,18±1,70	5,76±2,19	6,79±4,72	6,98±2,49	6,56±1,56
Количество плодов — $\bar{x}$, %	51,15±1,51	49,05±3,16	51,03±1,69	50,57±2,67	50,07±2,83	54,67±3,62	48,57±5,48	49,42±2,04	52,85±1,99
Количество плодов — σ , %	48,85±1,51	51,23±3,22	48,97±1,69	49,77±2,79	49,93±2,83	45,47±3,57	51,44±5,48	50,58±2,04	47,22±1,96

Примечание. По результатам дисперсионного анализа, в каждом из экспериментов, статистически значимых различий между группами не выявлено. Различия между группами проверяли с использованием U-критерия Манна-Уитни. * — обобщенный (исторический) контроль — средний результат по группам интактных животных за многолетний период наблюдений.

и 60 мг/кг (высшая доза — ВД, превышающая терапевтическую дозу в 10 раз) с 10-го по 13-й, с 26-го по 29-й и с 42-го по 45-й дни жизни. Животным контрольной группы (10 самцов и 25 самок) вводили плацебо аналогичным способом в дозе, соответствующей содержанию вспомогательных веществ в высшей (60 мг/кг) дозе Кагоцела, что составляет 440 мг/кг. Все исследуемые вещества (Кагоцел, плацебо) вводили внутривенно с помощью зонда один раз в день. В возрасте 2,5 мес крыс экспериментальных групп подсаживали к соответствующим партнёрам (в соотношении 1♂:2♀) на 10 дней. Для экспериментов первого этапа спаривание животных экспериментальных групп проводилось с интактными партнерами, для второго — между самцами и самками, каждый из которых получал исследуемый препарат в период их неполовозрелости. Первый день беременности определяли по наличию сперматозоидов в вагинальном мазке. По окончании беременности высчитывался индекс фертильности животных всех групп (по отношению количества беременных крыс-самок к числу подсаженных, %). После окончания подсадки, часть самцов ($n=5$) и самок ($n=5$) всех групп подвергались эвтаназии ингаляцией CO_2 . Крыс вскрывали, извлекали половые железы, фиксировали в растворе Карнуа. Готовили гистологические срезы для морфологической оценки состояния семенников и яичников, окрашивали их гематоксилин-эозином. По 5—7 беременных крыс-самок в каждой группе оставлялись до родов. Наблюдение за родившимся потомством проводили в течение 1 мес после рождения. Оценивали индекс выживаемости и динамику массы тела крысят на 4-, 7-, 14-, 21- и 28-й дни жизни. Для оставшейся части беременных крыс-самок на 20-й день беременности проводили эвтаназию методом ингаляции CO_2 . Затем производили вскрытие брюшной полости и подсчитывали число жёлтых тел в яичниках, мест имплантации, живых и мёртвых плодов в матке. На основании полученных данных вычисляли показатели пре- и постимплантационной гибели эмбрионов. Плоды извлекали. Проводили их наружный осмотр, определяли распределение по полу, размер, массу тела. В дальнейшем у одной части плодов исследовалось состояние внутренних органов (по методу Вильсона), у другой — процессов оссификации (по методу Доусона) [9]. При статистической обработке результатов за единицу наблюдения принимали средние значения для каждого помёта и данные, полученные при вскрытии одной самки. Полученные экспериментальные данные сравнивались с таковыми в контрольной группе (плацебо).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 7. Результаты исследований представлены в виде среднего значения параметра и стандартной ошибки отклонения. При сопоставлении средних значений и долей в группах предварительно проводили дисперсионный анализ (метод Краскела-Уоллиса) и использовали непараметрические U критерии Манна-Уитни и углового преобразования Фишера, с оценкой различий между группами при 95% уровне достоверности.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки показателей воспроизводящей функции крыс контрольных и экспериментальных групп представлены в табл. 2. Установлено, что индексы фертильности животных, получавших Кагоцел в ТД и ВД, не отличались от таковых в соответствующей контрольной группе. Количество жёлтых тел в яичниках, мест имплантации в матке, живых плодов, а также показатели эмбриональной гибели (пре- и постимплантационная смертность) у беременных крыс-самок экспериментальных групп статистически значимо не отличались от таковых в контроле. Полу-

Таблица 3. Состояние плодов в пометах крыс, получавших Кагоцел профилактическими курсами в неполовозрелом возрасте

Группы\Показатели	Интактные самки, спаренные с самцами, получающими препарат				Самки, получающие препарат, спаренные с самцами, подвергнутыми такому же воздействию			
	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг	Плацебо	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг	Плацебо	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг
Количество самок	5	6	7	7	7	7	4	6
Умеренные кровоизлияния в различных органах и тканях	36,67	43,24	38,10	42,50	47,73	34,15	34,78	37,50
Холестаз	6,67	2,70	4,76	7,50	2,27	4,88	4,35	9,38
Гидронефроз	3,33	5,41	2,38	5,00	9,09	4,88	8,70	6,25
Умеренные расширения желудочков головного мозга	6,67	5,41	2,38	2,50	4,55	2,44	8,70	3,13
Нефроз	3,33	2,70	4,76	5,00	6,82	2,44	4,35	6,25
Гемоперикард	30,00	32,43	11,90	17,50	15,91	12,20	17,39	31,25
Состояние процессов оссификации плодов								
Количество точек окостенения, ср. абс								
Плосна	2,45±0,14	2,66±0,10	2,85±0,05	2,42±0,13	2,73±0,11	2,84±0,10	2,48±0,25	2,71±0,12
Пястье	2,48±0,14	2,53±0,12	2,67±0,08	2,25±0,13	2,30±0,13	2,33±0,11	2,00±0,21	2,32±0,14
Крестец	1,55±0,14	1,61±0,13	1,80±0,14	1,47±0,14	1,70±0,16	1,69±0,12	1,52±0,19	1,37±0,13
Грудина	1,62±0,21	1,95±0,16	2,13±0,12	1,69±0,13	2,00±0,14	1,82±0,13	1,52±0,20	1,76±0,15
Рёбра	13,00±0,00	13,00±0,00	13,00±0,00	13,00±0,00	13,00±0,00	13,00±0,00	13,00±0,00	13,00±0,00
Наличие сформированных костей черепа, %	75,86	81,58	82,61	77,78	85,00	84,44	76,19	65,79

Таблица 4. Выживаемость и масса крысят, рожденных от животных, получавших Кагоцел профилактическими курсами в неполовозрелом возрасте

Группы\Показатели	Интактные самки, спаренные с самцами, получающими препарат				Самки, получающие препарат, спаренные с самцами, подвергнутыми такому же воздействию			
	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг	Плацебо	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг	Плацебо	Кагоцел 60 мг/кг	Кагоцел 6 мг/кг
Количество пометов	4	5	6	5	6	6	4	6
1—4	97,22±2,78	91,00±5,57	96,43±3,57	98,18±1,82	94,45±3,62	97,62±2,38	96,67±3,33	91,38±6,09
4—7	100,00±0,00	100,00±0,00	97,62±2,38	98,57±1,43	96,97±3,03	96,67±3,33	98,08±1,92	100,00±0,00
7—14	94,88±3,21	100,00±0,00	100,00±0,00	97,14±2,86	100,00±0,00	100,00±0,00	83,33±10,21	93,40±4,20
14—21	87,07±8,61	96,36±3,64	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
21—28	100,00±0,00	94,13±4,31	100,00±0,00	98,33±1,67	94,10±3,78	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
1—28	79,68±6,81	82,30±6,45	94,05±3,88	92,23±2,29	85,52±3,09	94,29±3,69	78,56±9,23	83,73±7,92
Масса тела, г								
4	7,08±0,32	7,83±0,34	7,92±0,24	7,53±0,11	7,41±0,12	7,80±0,11	7,22±0,14	7,34±0,13
7	10,81±0,63	11,96±0,52	11,72±0,30	11,83±0,88	11,28±0,12	11,88±0,21	11,53±0,44	10,71±0,22
14	21,78±1,41	24,76±0,44	22,24±0,53	25,56±1,33	22,45±0,24	23,36±0,05	22,93±0,85	23,01±0,29
21	37,14±0,76	40,29±1,59	36,63±0,80	36,54±0,13	38,02±0,04	38,67±1,10	39,54±1,20	39,65±0,37
28	64,34±0,95	65,15±1,43	60,48±2,31	62,61±2,00	60,08±0,86	60,67±0,85	68,56±0,92	63,72±2,44

ченные данные свидетельствуют о том, что субстанция Кагоцела в ВД и ТД не снижает способность к зачатию, не повышает риск самопроизвольного прерывания беременности, не вызывает в половых клетках генетических нарушений, приводящих к гибели оплодотворенной яйцеклетки.

При внешнем осмотре состояния плодов ($n=726$) аномалий развития обнаружено не было. Масса, размер плодов и распределение их по полу во всех исследуемых группах животных оказались сходными ($p \geq 0,017$). Количество плодов с наружными кровоизлияниями в экспериментальных группах статистически значимо не отличалось от таковых в группах контроля. Результаты оценки состояния внутренних органов и процессов оксификации плодов на 20-й день беременности представлены в табл. 3. Установлено, что у плодов контрольной группы (плацебо, $n=144$) выявлялись такие патологические изменения внутренних органов, как кровоизлияния в различные органы ткани, холестаз, гидронефроз, умеренное расширение желудочков головного мозга, нефроптоз, гемоперикард. В экспериментальных группах плодов ($n=206$) был обнаружен тот же спектр патологических изменений. Частота встречаемости отмеченных нарушений в сравниваемых группах оказалась сходной. Аномалий развития скелета у плодов ($n=293$) не наблюдалось. Состояние процессов оксификации плодов, судя по количеству точек окостенения плюсны, пястья, грудины, крестца, черепа в опыте и контроле, оказались сходными (см. табл. 2). Длительность беременности крыс-самок во всех группах составила 22–23 дня. Внешних аномалий развития у родившихся крысят ($n=516$) обнаружено не было. Индекс выживаемости и масса тела крысят экспериментальных групп во все исследуемые сроки наблюдения статистически значимо не отличались от контрольных значений (табл. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что введение Кагоцела в неполовозрелом возрасте крысам (самцам, самкам) в течение 3 курсов (по схеме профилактики) оказывало неблагоприятного влияния (при достижении ими репродуктивного возраста) на развитие их потомства как в антенатальном, так и постнатальном периоде.

Морфологическая картина семенников крыс, получавших Кагоцел, была сходной с таковой в контроле. Отёчности тестикулярной ткани не выявлялось, просвет сосудов не выглядел расширенным. Появления атрофированных извитых семенных канальцев не наблюдалось. Сперматогенный эпителий крыс-самцов экспериментальной группы, как и в контроле, был представлен сперматогониями, сперматоцитами, сперматидами, сперматозоидами. Истончения сперматогенной ткани не выявлялось. Про-

светы канальцев были свободными, слушивания гоноцитов в их просвет выявлено не было. В сперматоцитах 1- и 2-го порядка проходили активные процессы мейотического деления, о чём свидетельствовало наличие клеток с 7- и 12-й стадией мейоза. В просветах между сперматогониями как в опыте, так и в контроле, просматривались клетки Сертоли. Их клеточные мембраны не выглядели повреждёнными, что свидетельствовало о целостности гематотестикулярного барьера. Между извитыми семенными канальцами семенников всех обследуемых животных располагались интерстициальные эндокриноциты (клетки Лейдига). Большинство из них имели специфическую зернистость. Её наличие, как известно, характерно для функционально активных клеток. Морфологическая картина яичников крыс, получавших исследуемое лекарственное средство, оказалась сходной с таковой в контроле. Гемодинамических изменений обнаружено не было. В тканях желез выявлялись фолликулы, различной стадии зрелости: примордиальные, с двух- и более слоями гранулезных клеток, граафовы пузырьки. Достаточно часто можно было встретить атретические фолликулы. Отчётливо проявлялись формирующиеся жёлтые тела. Текальные оболочки не имели признаков дезорганизации. Интерстициальные клетки сохраняли свою целостность.

Таким образом, введение препарата Кагоцел крысам-самкам и крысам-самкам в неполовозрелом возрасте профилактическими курсами не вызывало патологических морфологических изменений в половых железах по достижении ими половозрелого возраста.

Выводы

Пероральное введение Кагоцела самцам и самкам крыс в течение всего периода неполовозрелости до достижения ими репродуктивного возраста в эквитерапевтической дозе (6 мг/кг) и в 10 раз её превышающей (60 мг/кг) тремя последовательными курсами с перерывами:

1. Не снижает способности животных к зачатию, не повышает риск самопроизвольного прерывания беременности, не вызывает в половых клетках генетических нарушений, приводящих к гибели оплодотворенной яйцеклетки;
2. Не оказывает токсического действия на потомство ни в антенатальном, ни в постнатальном периодах развития;
3. Не приводит к нарушению морфологического состояния половых желез.

Таким образом Кагоцел при пероральном введении не вызывает негативного воздействия на генеративную функцию животных. Введение Кагоцела периодически повторяющимися курсами на протяжении всего периода их неполо-

возрелости можно считать экспериментальной моделью применения препарата Кагоцел у детей раннего детского возраста (2—3 лет) и до периода полового созревания. Проведённые экспериментальные исследования могут служить

доказательной базой репродуктивной безопасности применения препарата Кагоцел для профилактики гриппа и других респираторных вирусных инфекций у часто болеющих детей и подростков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малахов А.Б., Кондюхина Е.Г., Елкина Т.Н., Ревякина В.А. Современные аспекты профилактики респираторных инфекций у детей с atopией. *Лечащий врач* 2007; 7: 1—3. / *Malakhov A.B., Kondjukhina E.G., Elkina T.N., Revjakina V.A. Sovremennye aspekty profilaktiki respiratornykh infekcij u detej s atopiej* *Lechashhij vrach* 2007; 7: 1—3. [in Russian]
2. Кузнецова М.А. Современные средства профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций у детей. *Саратовский научно-мед журн* 2012; 8: 3: 803—812. / *Kuznesova M.A. Sovremennye sredstva profilaktiki i lechenija ostrykh respiratornykh virusnykh infekcij u detej. Saratovskij nauchno-med zhurn* 2012; 8: 3: 803—812. [in Russian]
3. Харламова Ф.С., Кладова О.В., Учайкин В.Ф., Сергеева Э.М., Нестеренко В.Г., Легкова Т.П. и др. Возможности применения противовирусного препарата Кагоцел® для профилактики и лечения гриппа и других острых респираторных инфекций у часто болеющих детей младшего возраста. *Эффективная фармакотерапия* 2012; 1: 26—34. / *Kharlamova F.S., Kladova O.V., Uchajkin V.F., Sergeeva E.M., Nesterenko V.G., Legkova T.P. i dr. Vozmozhnosti primeneniya protivovirusnogo preparata Kagocel® dlja profilaktiki i lechenija grippa i drugikh ostrykh respiratornykh infekcij u chasto bolejuushhikh detej mladshogo vozrasta. Jeffektivnaja farmakoter* 2012; 1: 26—34.
4. European Food Safety Authority. Scientific opinion. Gossypol as undesirable substance in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2005-222). *The EFSA Journal* 2008; 908: 1—55.
5. de Peyster A., Wang Y. Genetic toxicity studies of gossypol. *Mutat. Res* 1993; 297: 3: 293—312.
6. An T., Ouyang W., Pan W., Guo D., Li J., Li L. et al. Amino acid derivatives of the (-) enantiomer of gossypol are effective fusion inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res* 2012; 94 (3): 276—287.
7. Рыбалкин С.П., Ковалева Е.В., Гуськова Т.А., Савинова Т.Б. Экспериментальная оценка влияния препарата Кагоцел на генеративную функцию животных. *Токсикол вестник* 2013; 2: 19: 33—38. / *Rybal'kin S.P., Kovaleva E.V., Gus'kova T.A., Savinova T.B. Jeksperimental'naja ocenka vlijanija preparata Kagocel na generativnuju funkciju zhivotnykh. Toksikol vestnik* 2013; 2: 19: 33—38. [in Russian]
8. Боровская Т.Г., Полуэктова М.Е., Выхужанина А.В., Машанова В.А., Шемерова Ю.А. Экспериментальная оценка влияния препарата Кагоцел на генеративную функцию крыс-самцов пубертатного возраста. *Бюллетень экспер биол мед* 2017; 163: 2: 176—179. / *Borovskaja T.G., Polujektova M.E., Vychuzhanina A.V., Mashanova V.A., Shhemerova Ju.A. Jeksperimental'naja ocenka vlijanija preparata Kagocel na generativnuju funkciju krys-samcov pubertatnogo vozrasta. Bjulleten' jeksper biol med* 2017; 163: 2: 176—179. [in Russian]
9. Дурнев А.Д., Смольникова Н.М., Скосырева А.М., Немова Е.П., Соломина А.С., Гуськова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: ФГБУ НЦЭСМП; 2012; 80—93. / *Durnev A.D., Smol'nikova N.M., Skosyreva A.M., Nemova E.P., Solomina A.S., Gus'kova T.A. i dr. Metodicheskie rekomendacii po izucheniju reproduktivnoj toksichnosti lekarstvennykh sredstv. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. M.: FGBU NCJeSMP; 2012; 80—93. [in Russian]*

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Боровская Татьяна Геннадьевна — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией фармакологии репродуктивной системы НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга, Томск

Машанова Валерия Александровна — м.н.с. лаборатории фармакологии репродуктивной системы НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томск

Фармакогенетика и воспалительные заболевания кишечника у взрослых и детей: перспективы диагностики и лечения

С. Ю. СЕРЕБРОВА^{1,2}, А. Б. ПРОКОФЬЕВ^{1,2}, М. В. ЖУРАВЛЕВА^{1,2}, Р. Е. КАЗАКОВ¹,
И. В. СИЧИНАВА², Г. И. ГОРОДЕЦКАЯ^{1,2}, Н. Н. ЕРЕМЕНКО^{1,2}, Н. Б. ЛАЗАРЕВА²,
Л. Р. ГАЛСТЯН², Е. А. СМОЛЯРЧУК², Д. О. КУРГУЗОВА², А. О. БАРКОВ²

¹ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

² Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Pharmacogenetics and Inflammatory Bowel Diseases in Adults and Children: Diagnosis and Treatment Prospects

S. YU. SEREBROVA^{1,2}, A. B. PROKOFIEV^{1,2}, M. V. ZHURAVLEVA^{1,2}, R. E. KAZAKOV¹, I. V. SICHINAVA², G. I. GORODETSKAYA^{1,2},
N. N. EREMEKO^{1,2}, N. B. LAZAREVA², L. R. GALSTYAN², E. A. SMOLYARCHUK², D. O. KURGUZOVA², A. O. BARKOV²

¹ Scientific Center for Expertise of Means of Medical Application of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

В статье освещены современные представления о воспалительных заболеваниях у взрослых и детей с точки зрения генетических возможностей диагностики болезни Крона и язвенного колита. Названы основные гены-кандидаты, которые при наличии их определённых полиморфизмов свидетельствуют о появлении высокого риска развития воспалительных заболеваний кишечника. Описаны принципы современной терапии, возможности фармакогенетического тестирования в прогнозировании эффективности или рисков снижения безопасности терапии лекарственными препаратами. Названы современные тенденции и перспективы в лечении язвенного колита и болезни Крона.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, фармакогенетика, полиморфизмы, 5-АСК, месалазин, иммуномодуляторы, глюкокортикостероиды, моноклональные антитела.

The article highlights modern concepts of inflammatory diseases in adults and children in terms of genetic possibilities for diagnosing Crohn's disease and ulcerative colitis. It names the main candidate genes, which, in the presence of their specific polymorphisms, indicate the occurrence of a high risk of inflammatory bowel disease. The principles of modern therapy, the possibilities of pharmacogenetic testing in predicting the effectiveness or risks of reducing the safety of drug therapy are described. The article focuses on modern trends and perspectives in ulcerative colitis and Crohn's disease treatment.

Keywords: inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn's disease, pharmacogenetics, polymorphisms, 5-ASA, mesalazine, immunomodulators, glucocorticosteroids, monoclonal antibodies.

Медицинская генетика — раздел науки о наследственности и изменчивости, изучающий роль генетических факторов в этиологии и патогенезе различных заболеваний человека. Клиническая фармакогенетика — раздел клинической фармакологии и медицинской генетики, изучающий генетические особенности пациента, влияющие на фармакологический ответ [1].

Болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК) вместе с более редко встречающимися атипичным микроскопическим колитом, лимфоцитарным колитом и коллагенозным колитом формируют группу воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) — хронических, иммуноопос-

редованных патологических состояний пищеварительного тракта, характеризующихся хроническим рецидивирующим язвообразованием в различных его отделах, наиболее часто — в дистальном отделе подвздошной и толстой кишок, с вариативной, в зависимости от формы заболевания, глубиной поражения.

ВЗК более часто встречаются в промышленно развитых странах, по сравнению с неиндустриализованными, причём самые высокие показатели заболеваемости отмечены в Скандинавии, Соединённом Королевстве и Северной Америке. Однако классическое географическое распределение ВЗК изменяется в связи с повышением уровня развития тех или иных регионов. В последние годы показатели заболеваемости выросли и в странах Восточной Европы. Причины такого роста окончательно не выяснены, но

© Коллектив авторов, 2017

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

определённую роль здесь несомненно играет повышение качества медицинских услуг и возможностей диагностики патологии [1]. Географическая распространённость в Европе и Северной Америке ВЗК у детей соответствует таковой у взрослых. Кроме стран Скандинавии, высокая заболеваемость отмечена во Франции, Чешской Республике: здесь БК превалирует над ЯК, а в скандинавских странах преобладает ЯК [2].

Для педиатрии БК и ЯК имеют особое значение, так как у детей в период повышенной потребности в питании, связанной с их ростом и развитием, ВЗК сопровождаются снижением аппетита, абсорбционной активности кишечника, метаболическими расстройствами, что тормозит увеличение массы тела и линейный рост, приводит к нарушению минерализации костей, задержке полового развития, снижению самооценки и социализации [3, 4].

Диагноз ВЗК устанавливается на основании клинических, эндоскопических, радиологических и гистологических данных, формирующих различные рекомендованные диагностические критерии.

Этиология ВЗК остается неизвестной, но считается, что заболевания вызываются сложным взаимодействием микробных, генетических, иммунологических и внешних факторов, включая продукты питания и табакокурение; в результате длительная и чрезмерная активация иммунной системы слизистых оболочек приводит к потере толерантности к представителям комменсальной микрофлоры. Согласно последним представлениям, ВЗК, вероятно, являются следствием аномального иммунного ответа слизистой оболочки на антигены кишечной бактериальной микрофлоры у генетически восприимчивых индивидуумов.

Как и при большинстве воспалительных заболеваний, микрофлора кишечника играет важную роль в патогенезе ВЗК, однако попытки найти специфического возбудителя успехом не увенчались [1].

Наследственные факторы несомненно лежат в основе избыточного иммунологического ответа макроорганизма на присутствующие в кишечнике микроорганизмы. Пока не уточнены безусловные предикторы БК и ЯК, но описан ряд генов-кандидатов, кодирующих белки, обеспечивающие барьерную функцию слизистой оболочки или регулирующие её иммунные реакции; с полиморфизмами генов-кандидатов связывают повышенный риск возникновения ВЗК.

Прорыв в понимании связи между генетической предрасположенностью и развитием ВЗК произошел в 2001 году, когда три независимые исследовательские группы сообщили об идентификации первого гена, ассоциированного с повышенным риском БК, — *NOD2*, впоследствии

переименованного Международным номенклатурным Комитетом в *CARD15*, локализованного на 16-й хромосоме в участке 16q12. Ген *CARD15* кодирует цитозольный белок, экспрессирующийся в моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и клетках Панета. Этот белок-рецептор распознавания паттерна реагирует на присутствие мурамилдипептида пептидогликанов, пенетрировавших в клетку грамположительных и грамотрицательных бактерий. С помощью нуклеарного фактора κB (NF- κB) он активирует образование провоспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), и дефенсинов, улучшающих барьерную функцию эпителия. У гена *CARD15* наиболее распространены полиморфизмы, связанные с аминокислотными заменами Arg702Trp и Gly908Arg, а также инсерция нуклеотида, включающего цитозин (Leu1007fsinsC), что приводит к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона. Также встречается множество более редких вариантов. Примерно 10–30% пациентов с БК гетерозиготны по одному из трёх упомянутых полиморфизмов, а около 3–15% пациентов являются носителями двух редких аллелей, и в этом случае они либо гомозиготны по одному полиморфизму, либо гетерозиготны по двум из них. Относительный риск развития БК составляет 1,5–3 для носителей одного и 10–40 для носителей двух патологических аллелей [5, 6].

На клиническом уровне полиморфизмы *CARD15* ассоциированы с ранним дебютом БК, поражением подвздошной кишки с частым развитием стриктур, высокой степенью активности заболевания, увеличением потребности в хирургическом лечении. В то же время наиболее распространённые полиморфизмы *CARD15* не ассоциированы с поражением перианальной области, наличием внекишечных поражений [6, 7].

Другие рецепторы распознавания паттерна — толл-подобные рецепторы (TLR), они реагируют на микробные липопротеины (TLR1, 2, 6), двухцепочечные РНК (TLR3), липополисахарид (TLR4), флагеллин (TLR5), одноцепочечные РНК (TLR7, 8) и ДНК CpG (TLR9). Полиморфизмы генов, кодирующих TLR и рецептор *CARD4*, также могут повышать риск развития ВЗК.

Связывание специфических микробных компонентов с рецепторами распознавания паттерна в большинстве случаев, включая *CARD15*, приводит к активации ядерного фактора- κB (NF- κB). NF- κB является внутриклеточной сигнальной молекулой, играющей ключевую роль при различных воспалительных процессах, и при ВЗК его количество в тканях повышается. Однако носительство определённых аллельных вариантов гена *CARD15* приводит не к сверхактивации NF-

κ B, а напротив, к снижению его активности. Было высказано предположение, что поломка защитных механизмов, опосредованных CARD15, приводит к «дефектной бактериальной эрадикации» с активацией NF- κ B независимыми от CARD15 механизмами.

Активные рецепторы распознавания паттернов необходимы для различения патогенных и комменсальных микроорганизмов. Если механизм распознавания нарушен, иммунный ответ может быть вызван непатогенными бактериями, что ведёт к увеличению продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов.

В слизистой оболочке пациентов с БК доминируют Т-хелперы первого типа (CD4⁺ Th1-клетки), характеризующиеся образованием γ -интерферона и интерлейкина-2, в то время как в слизистой оболочке пациентов с ЯК преобладают Т-хелперы второго типа (CD4⁺ Th2-клетки), образующие трансформирующий фактор роста β (TGF- β) и интерлейкин-5 (ИЛ-5). Цитокины Th1 активируют макрофаги, продуцирующие комплекс высокоактивных цитокинов, таких как интерлейкин-12 (ИЛ-12), интерлейкин-18 (ИЛ-18), фактор ингибирования миграции макрофагов, фактор некроза опухолей (TNF), интерлейкин-1 (ИЛ-1) и интерлейкин-6 (ИЛ-6). Таким образом, непереносимость кишечных микроорганизмов из-за генетической восприимчивости в дополнение к возможному изменению количественного и качественного состава микрофлоры может приводить к появлению, прогрессированию и рецидивированию воспалительных процессов в кишечнике [5].

Для индукции иммунологического ответа на вещества бактериального происхождения необходимо увеличение проницаемости клеточных мембран. Известно множество молекулярных механизмов повышения кишечной проницаемости у пациентов с ВЗК, в том числе редукция, изменения состава и разрывы белковых нитей плотных контактов, а также апоптоз эпителиальных клеток. Однако генетические причины для структурно-функциональных изменений плотных контактов не выявлены, и эти дефекты не обнаруживаются у здоровых людей, что говорит о том, что описанные явления могут быть следствием, а не причиной ВЗК [8].

Была продемонстрирована роль интерлейкина-23 (ИЛ-23) и его полиморфизма в развитии ВЗК. ИЛ-23 — провоспалительный цитокин, имеющий уникальную субъединицу p19. В эксперименте было показано, что селективная блокада субъединицы ИЛ-23 p19 в модели колита уменьшает интенсивность кишечного воспаления и ингибирует развитие спонтанного колита при дефиците ИЛ-10. ИЛ-23 увеличивает и поддерживает экспрессию ИЛ-17 CD4⁺ Th17-клетками. В

норме продукция ИЛ-23 и ИЛ-17 способствует укреплению эпителиального барьера за счет синтеза дефенсинов, а также уменьшению бактериальной колонизации. При нарушении иммунного ответа активированные дендритные клетки начинают продуцировать большое количество ИЛ-23, который стимулирует синтез провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6 и продукцию ИЛ-17, запускающего дополнительные воспалительные каскады. Гены *IL12B*, *JAK2* и *STAT3*, продукты которых участвуют в реализации эффектов ИЛ-23, ассоциированы с БК и НЯК, и у пациентов с активными формами БК и ЯК повышен уровень экспрессии ИЛ-17 в плазме и слизистой оболочке кишечника, но не в селезёнке, печени и других органах [7, 9]. Также с болезнью Крона ассоциирован полиморфизм гена криопирина NLRP3, регулирующего активацию капазы-1 и ИЛ-1 β [9].

Аутофагия — процесс, посредством которого клетки переваривают часть собственной цитоплазмы, функционирующей для поддержания гомеостаза и удаления внутриклеточных бактерий. Важным событием стало открытие ассоциации между повышенным риском развития БК и генами, связанными с аутофагией: *ATG16L1* (участвует в регуляции образования аутофагосомы) и *IRGM* (его продукт участвует в изоляции и деградации бактерий). В этом отношении интересен полиморфизм *ATG16L1*300A*, а также, по данным Wellcome Trust Case Control Consortium (2007), два однонуклеотидных полиморфизма (rs13361189 и rs4958847), находящихся во фланкирующей области гена *IRGM*, которым посвящено достаточное количество публикаций [6, 9]. Уделяется также много внимания участию полиморфизмов этих генов в патогенезе различных заболеваний пищеварительного тракта, и уточнение их клинической значимости продолжается [6].

Исследуется также роль факторов врождённого иммунитета в поддержании иммунного гомеостаза слизистой оболочки, при нарушении которого возможно развитие ВЗК. Достаточно хорошо изучена ассоциация генов *OCTN1/SLC22A4* и *OCTN2/SLC22A5* с риском развития БК. Полиморфизмы *C1672T* гена *SLC22A4* и *G207C* гена *SLC22A5* увеличивают риск развития БК в 2—2,5 раза при гетерозиготном и в 4 раза при монозиготном носительстве. Названные гены кодируют мембранные белки, транспортирующие карнитин и органические катионы. Карнитин участвует в переносе длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии, где происходит их β -окисление, т.е. он важен для энергообеспечения клетки. Нарушение окисления жирных кислот приводит к появлению клинических и морфологических признаков колита. Другим возможным механизмом участия поли-

морфизма гена *OCTN1* в развитии патологии кишечника является вероятный рост активности белков-транспортёров органических катионов с повышением захвата токсичных веществ. Интересен аддитивный эффект полиморфизмов генов *OCTN1* и *CARD15*: при этом риск развития БК у носителей обоих признаков резко повышается, отношение шансов составляет 7,3—10,5 [6].

И, наконец, ещё одним важным геном, с точки зрения диагностики и лечения ВЗК, является ген АТФ-связывающего кассетного транспортёра A1 (*ABCB1*), расположенный на длинном плече 7-й хромосомы. Его продуктом является Р-гликопротеин — мембранный белок, функционирующий как энергозависимая помпа, которая снижает внутриклеточную концентрацию токсинов и ксенобиотиков. Описаны два полиморфизма этого гена — *C3435T* и *G2677T*, ассоциированные с повышенным риском развития ВЗК. Причём, в некоторых популяциях показана связь генотипа с особенностями клинического течения заболевания. Так, пациенты с ЯК — носители аллеля 3435T в шотландской популяции склонны к развитию панколита [6].

Недавние исследования показали, что связанный с полиморфизмами соответствующего гена дефицит эпоксигеназы *CYP2J2* приводит к снижению бактериального фагоцитоза и может негативно регулировать бактериальный клиренс при БК. Геном-кандидатом, ассоциированным с повышенным риском ЯК, можно также считать *ECM1*: гомозиготная нонсенс-мутация или мутация со сдвигом рамки считывания этого гена связаны с редкой аутосомной патологией, протекающей с поражением кожи и кишечника [10].

Молекулы матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов играют ключевую роль в аномальном фиброгенезе, который у больных БК лежит в основе развития стриктур кишечника. Обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы в генах, кодирующих матриксную металлопротеиназу-3 (*MMP-3*), и тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 (*TIMP-1*), влияющие на предрасположенность к БК и её фенотип, то есть на локализацию поражения [11].

Подробный обзор всех генов и выявленных полиморфизмов (более 200), ассоциируемых с ВЗК, в публикации данного формата невозможен, а простое их перечисление бессмысленно. Поскольку ни один известный полиморфизм какого-либо гена, ассоциируемого с БК или ЯК, пока не является их безусловным генетическим предиктором и может быть общим признаком повышенного риска для обоих заболеваний и состояний, протекающих с ВЗК-подобными симптомами (см. ниже), будущими генетическими маркерами патологии могут быть как ещё невыясненные полиморфизмы неуточнённых генов, так и сочетания

множества полиморфизмов. Сейчас предпринимаются попытки увеличить чувствительность генетического тестирования возможных маркеров заболеваний их комплексным ассоциативным анализом. Так, группой исследователей было показано, что для дифференциальной диагностики БК и ЯК можно использовать уровни экспрессии (количественное определение мРНК в тканях) комплекса генов: *SLC6A14*, *SLC26A2*, *GRO*, *MMP7*, *SPAP*, *REG4*, *VNN1*. Утверждается, что уровень экспрессии всех перечисленных генов, кроме *SLC26A2*, при БК превышает таковой при ЯК, а уровень экспрессии *SLC26A2*, наоборот, выше при ЯК, чем при БК [12, 13].

Современные рекомендации по лечению ВЗК предполагают поэтапный выбор максимально эффективных и безопасных фармакопрепаратов для коррекции симптомов и дискомфорта, с ними связанного. На начальном этапе рекомендуется назначение производных 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) с антибиотиками или без них, а затем с глюкокортикоидами, иммуномодуляторами и биопрепаратами. При отсутствии эффекта фармакотерапии или осложнениях ВЗК применяются хирургические методы лечения [4, 14].

Первым препаратом группы производных 5-АСК является сульфасалазин, который включает молекулы сульфапиридина и 5-АСК; он используется для лечения ЯК уже в течение десятилетий. Сульфасалазин часто вызывает значимые нежелательные лекарственные реакции (НЛР), такие как диспепсия, тошнота, рвота, боли в животе, головная боль, аллергия на сульфапиридин, гемолитическая анемия, нейтропения, лекарственный гепатит, синдром Стивенса-Джонсона, перикардит, интерстициальный нефрит, панкреатит. Чтобы сократить количество НЛР, препарат был модифицирован до месалазина (5-АСК без сульфапиридина) с предположением, что он не утратит свой основной фармакодинамический эффект. Надежды оправдались, и новый препарат стало возможным применять в более высоких дозах, отказавшись в некоторых случаях от использования глюкокортикостероидов. Месалазин активен при местном контакте со слизистой оболочкой кишечника, его терапевтическая эффективность зависит от концентрации в просветном содержимом, что позволило создавать препараты с модифицированным (зависящим от pH среды) высвобождением, доставляющие активное действующее вещество максимально близко к поражённым участкам кишечника. Механизм действия 5-АСК реализуется путём блокады синтеза простагландинов, снижения образования интерлейкинов ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО- α , торможения липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты, образования свободных радикалов [15].

Тем не менее, применение производных 5-АСК вызывает настороженность в связи с тем, что их эффективность и безопасность могут зависеть от фармакогенетических факторов, так как они являются субстратами двух полиморфных N-ацетилтрансфераз (NAT) NAT1 и NAT2, а среди пациентов есть медленные и быстрые метаболиты (ацетиляторы). Для гена *NAT2* описано одиннадцать однонуклеотидных полиморфизмов. Быстрый ацетилирующий фенотип по *NAT2* связывают с гаплотипом *NAT2*12A*, а медленный — с *NAT2*5B*, *NAT2*6A*, *NAT2*5A*, *NAT2*5C*, *NAT2*7B*, *NAT2*14A*. Примерно 50% европейцев, 30% негроидов и 15% монголоидов являются медленными метаболитами по *NAT2*. Медленную скорость ацетилирования по *NAT1* связывают с гаплотипами *NAT*14A*, *NAT1*14B*, *NAT1*17*, *NAT1*19* и *NAT1*22*.

Сульфасалазин расщепляется в кишечнике бактериальными азо-редуктазами на 5-АСК и сульфапиридин, последний ацетируется в печени с помощью *NAT2* до N-ацетил-сульфапиридина. При низкой скорости ацетилирования у медленных метаболитов по *NAT2* возрастает риск НЛР сульфасалазина. 5-АСК ацетируется в печени до N-ацетил-5-АСК с помощью *NAT1*. В настоящее время неизвестно, имеют ли установленные полиморфизмы гена данного фермента значение в плане эффективности и безопасности терапии препаратами месалазина [16, 17].

Проведённые фармакогенетические исследования с препаратами 5-АСК предоставили лишь малую долю информации, необходимой для обеспечения эффективности и безопасности их применения. Так, отсутствуют сведения, будут ли влиять полиморфизмы генов, кодирующих транспортные белки, на результаты терапии сульфасалазином и месалазином, если известно, что 5-АСК является субстратом (*OATP1B1*, *OATP1B3*, *OATP2B1*), а активность (*OATP2B1*) может изменяться при ВЗК [18, 19].

В связи с изложенными выше особенностями участия кишечной микрофлоры в патогенезе ВЗК, антибактериальная терапия в лечении БК и ЯК не относится к терапии первой линии.

Метронидазол показал свою эффективность при БК с перианальными поражениями, способствуя уменьшению явлений воспаления, активации регенераторных процессов и уменьшению интенсивности болевого синдрома. Антибиотики могут использоваться в комплексной терапии с другими лекарственными препаратами в активной фазе ВЗК, при лечении специфических осложнений болезни Крона (интраабдоминальные абсцессы, свищи, перианальные поражения, избыточный бактериальный рост в тонкой кишке, вторичный по отношению к частичной обструкции тонкой кишки) или для профилактики реци-

дива заболевания в послеоперационном периоде и т.д. Наряду с метронидазолом, наиболее часто используется цiproфлоксацин. У пациентов с БК антибиотики более эффективны при поражении толстой кишки, чем дистальных отделов подвздошной; при лёгкой и средней степени тяжести заболевания иногда используется антибактериальная терапия с метронидазолом, цiproфлоксацином, реже сульфаметоксазолом / триметопримом и тетрациклином, но она не продемонстрировала каких-либо преимуществ, по сравнению с глюкокортикоидами, в рандомизированных клинических исследованиях [15].

Эффективности антибиотикотерапии при лечении ВЗК посвящён систематический обзор K.J.Khan и др. [20], включающий анализ результатов 10 рандомизированных клинических исследований (1160 пациентов), в которых применялись макролиды, фторхинолоны, нитроимидазолы, ансамицины (в виде монотерапии или в комбинации). Было показано, что антибиотикотерапия способствует индукции ремиссии при назначении в активной фазе БК и ЯК. Эффективность использования метронидазола и цiproфлоксацина, оцениваемая по уменьшению объёма отделяемого из перианальных фистул, подтверждена в трёх клинических исследованиях. Авторы обзора констатировали, что для определения оптимального препарата и продолжительности курса антибактериальной терапии при ВЗК необходимы дальнейшие клинические исследования [20, 21].

Среди глюкокортикоидов при ВЗК наиболее часто используются преднизолон, метилпреднизолон, гидрокортизон, в некоторых случаях назначают топический препарат будесонид. Глюкокортикоиды оказывают противовоспалительный эффект, подавляя транскрипцию интерлейкинов, метаболизм арахидоновой кислоты и стимулируя апоптоз лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника. Помимо серьёзных НЛР, свойством глюкокортикоидов является способность вызвать зависимость и резистентность (в 16—40% случаев) в течение года постоянного применения. Во-первых, глюкокортикоиды являются субстратами Р-гликопротеина, и развитие резистентности связывают с повышением уровня экспрессии кодирующего его гена *ABCB1*. Вторым механизмом развития резистентности называют дисфункцию на уровне рецепторов глюкокортикоидов с активацией NF-κB, что приводит к снижению транскрипционной активности этих рецепторов [6].

Азатиоприн является антиметаболитом — пуриновым аналогом, нарушающим синтез нуклеотидов, образование ДНК и РНК, подавляющим пролиферацию тканей. Азатиоприн вместе с его активным метаболитом 6-меркаптопурином ока-

зывает иммунодепрессивное действие, обусловленное гипоплазией лимфоидной ткани, снижением количества Т-лимфоцитов, нарушением синтеза иммуноглобулинов, формированием атипичных фагоцитов и, в конечном итоге, подавлением клеточно-опосредованных реакций гиперчувствительности. В связи с медленным (в течение 3 мес.) развитием основного фармакодинамического эффекта, тиопурины не рекомендуются для индукции ремиссии ВЗК и применяются только в качестве поддерживающей терапии. В связи с серьезными НЛР, наиболее тяжелой среди которых является миелосупрессия, часто приходится отказываться от терапии азатиоприном и меркаптопурином.

6-Меркаптопурин при участии тиопуринов-S-метилтрансферазы (ТРМТ) превращается в неактивный 6-метилмеркаптопурин. Активность указанного фермента зависит от полиморфизма гена *ТРМТ*, и у медленных метаболизаторов биотрансформация 6-меркаптопурина идет, в основном, по пути превращения с помощью гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы в 6-тиоинозинмонофосфат, из которого образуются активные 6-тиогуанины (6-тиогуанинмонофосфат, 6-тиогуаниндифосфат и 6-тиогуанинтрифосфат), высокотоксичные в отношении костного мозга. Наоборот, высокая активность тиопуринов-S-метилтрансферазы приводит к снижению клинической эффективности азатиоприна и 6-меркаптопурина, к необходимости повышения их доз, а повышение доз препаратов приводит к увеличению концентраций неактивного, но гепатотоксического 6-метилмеркаптопурина.

Два наиболее распространенных гаплотипа гена *ТРМТ* (*ТРМТ*1* и *ТРМТ*1S*) встречаются с частотой около 90% и характеризуются нормальной или повышенной экспрессией. Более 20 известных полиморфизмов *ТРМТ* (гаплотипы *ТРМТ*2*, **3A*, **3B*, **3C*, **3D*, **4–15* и др.) определяют медленный метаболизм. Редкий аллельный вариант с заменой гуанина на аденин в позиции 460 (460G>A) наблюдается лишь у 0,3% населения, но определяет крайне низкую активность тиопуринов-S-метилтрансферазы и 6-тиогуаниновую направленность метаболизма тиопуринов.

Риск возникновения НЛР азатиоприна и 6-меркаптопурина связывают также с дефицитом инозинтрифосфатпирофосфатазы (ИТРА), инактивирующей 6-тиоинозинмонофосфат, и этот дефицит приводит к повышению концентраций токсичных метаболитов. По некоторым сведениям, однонуклеотидная замена С94А в гене ИТРА ассоциирована с риском развития гриппоподобного синдрома, сыпи, панкреатита и гемолитической анемии при приеме тиопуринов. Имеющиеся данные по фармакогенетике азатиоприна и 6-меркаптопурина пока неполные и недостаточ-



Рис. 1. Значение генетических и внешних факторов у больных с воспалительными заболеваниями кишечника в разном возрасте [22].

ные для формирования практических рекомендаций по использованию фармакогенетического тестирования при назначении и выборе режимов дозирования этих препаратов. Отмечается, что препараты — производные 6-тиогуанина не метаболизируются с помощью ТРМТ и ИТРА, что делает оправданным их применение у больных с резистентностью к тиопуринам, повышенной активностью ТРМТ и сниженной активностью ИТРА. Однако 6-тиогуанины повышают риск развития нодулярной регенераторной гиперплазии печени и веноокклюзионной болезни [17].

Эффект метотрексата связан с ингибированием синтеза пуриновых нуклеотидов. Полиморфизмы генов, участвующих в метаболизме метотрексата, увеличивают риск развития НЛР не у больных с ВЗК, а у онкологических пациентов, принимающих высокие дозы препарата. В плане фармакогенетики важным аспектом является то, что метотрексат и его метаболит 7-гидроксиметотрексат являются субстратами фермента-транспортёра BCRP, активность которого может снижаться, например под действием ингибиторов протонной помпы; такое лекарственное взаимодействие оценивается как серьезное. Значение фармакогенетических факторов с точки зрения эффективности и безопасности терапии биологическими препаратами изучается [17].

Особое внимание наследственным факторам следует уделять у детей с ВЗК с очень ранним, до 6 лет, началом (ОРН-ВЗК) (рис. 1). Если в более позднем возрасте генетические маркеры только ассоциированы с повышенным риском развития ВЗК, то при ОРН-ВЗК вероятно наличие моногенных факторов, изменяющих иммунный ответ, поэтому такие варианты патологии часто связаны с первичными иммунодефицитными состояниями с возможными нарушениями эпителиального барьера, фагоцитарных функций, активности Т- и В-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток (таблица).

Моногенные синдромы, ассоциированные с ВЗК [23, 24]

Группа факторов	Синдром / болезнь	Гены	Наследование	Ассоциируемые состояния	
				БК	ЯК
Эпителиальный барьер	Буллезная дистрофия	<i>COL7A1</i>	АР		+
	Х-ассоциированная эктодермальная дисплазия с иммунодефицитом	<i>IKBK</i>	Х	+	
	Дефект TTC7A	<i>TTC7A</i>	АР		+
	Дефект ADAM17	<i>ADAM17</i>	АР		+
	Семейная диарея	<i>GUCY2C</i>	АД	+	
Фагоцититарные дефекты	Гранулематозная болезнь	<i>CYBB</i>	Х	+	
		<i>CYBA, NCF1, NCF2, NCF4</i>	АР	+	
	Гликогеноз 1b типа	<i>SLC37A4</i>	АР	+	
	Врожденная нейтропения	<i>G6PC3</i>	АР	+	
	Дефекты адгезии лейкоцитов	<i>ITGB2</i>	АР	+	
Гипер- и аутовоспалительные заболевания	Дефекты фосфолипазы C-γ2	<i>PLCG2</i>	АД		+
		<i>XLP2</i>	Х	+	
Дефекты Т- и В-лимфоцитов	Синдром Германски-Пудлака	<i>HPS1, HPS4</i>	АР	+	
	ОВИД 8	<i>LRBA</i>	АР	+	
	Дефицит IL-21	<i>IL21</i>	АР	+	
	А-γ-глобулинемия	<i>BTK</i>	Х	+	
	Гипер-IgM	<i>AICDA</i>	АР	+	
	Синдром Вискотта-Олдрича	<i>WAS</i>	Х		+
	Синдром Оменна	<i>DCLRE1C</i>	АР	+	
	ТКИН	<i>RAG2</i>	АР		+
		<i>DKC1</i>	АР	+	
Иммунорегуляция	Дефекты IL-10	<i>IL10RA, IL10RB, IL10</i>	АР	+	

Примечание. АР — аутосомно-рецессивный; Х — сцепленный с Х-хромосомой; АД — аутосомно-доминантный; ОВИД — общий вариабельный иммунодефицит; АИГ — аутоиммунный гепатит; ТКИН — тяжёлый комбинированный иммунодефицит.

Вероятно, данный фрагмент обзора следовало разместить в описании генетических особенностей больных с ВЗК, однако при возникновении в раннем возрасте БК и ЯК не только протекают особенно тяжело, но и требуют более агрессивной терапии, результаты которой часто неудовлетворительны. То есть, ОРН-ВЗК определяет эффективность, точнее, высокую вероятность неэффективности используемых фармакопрепаратов, и скрининг моногенных синдромов, ассоциированных с воспалительными заболеваниями кишечника, представляется желательным [22].

Таковы современные возможности генетики и фармакогенетики в диагностике и лечении ВЗК. По данным Эпидемиологического комитета (EpiCom), сформированного Европейской объединённой группой по исследованию воспалительных заболеваний кишечника (ЕС-IBD) и Европейской организацией болезни Крона и воспалительных заболеваний кишечника (ЕССО), за 2006—2010 гг., по сравнению с Западной Европой, пациентам с ВЗК из Восточной Европы, в том числе России, чаще назначают препараты 5-АСК, реже — биологические препараты (рис. 2, 3). Терапию биологическими препаратами (инфликсимаб или адалимумаб) больные с БК получали в Западной Европе в 21% случаев, в Восточной Европе, включая РФ (данные специализированных центров г. Москвы), в 6% случаев.

При ЯК биологические препараты назначались в Западной Европе в 6% случаев, а в Восточной Европе — в 1% случаев [1]. Эта ситуация требует анализа и решения вопроса о доступности наиболее современных лекарственных препаратов нашим соотечественникам.

Авторы настоящего обзора обратили внимание на раннее (в течение года после установления диагноза) назначение пациентам с ВЗК иммуномодуляторов. Применение иммуномодуляторов было рекомендовано в 1990-х годах при глюкокортикоидной зависимости, но стремительная эскалация количества больных, которым эти препараты назначаются в короткие сроки от начала терапии, вероятнее всего говорит о наступлении «эры заживления слизистых оболочек» — декларируемой цели фармакотерапии ВЗК.

Что касается ближайших перспектив развития фармакотерапии, можно сказать, что мы находимся лишь на пороге если не эпохи, длительного периода применения препаратов — гуманизированных моноклональных антител, которые можно сравнивать с «золотой пулей» в связи с их высокой селективностью. Уже сейчас зарегистрирован ведолизумаб (моноклональные антитела против IgG1), вероятно расширение показаний для устекинумаба (моноклональные антитела против общей субъединицы p40 ИЛ-23 и ИЛ-12).

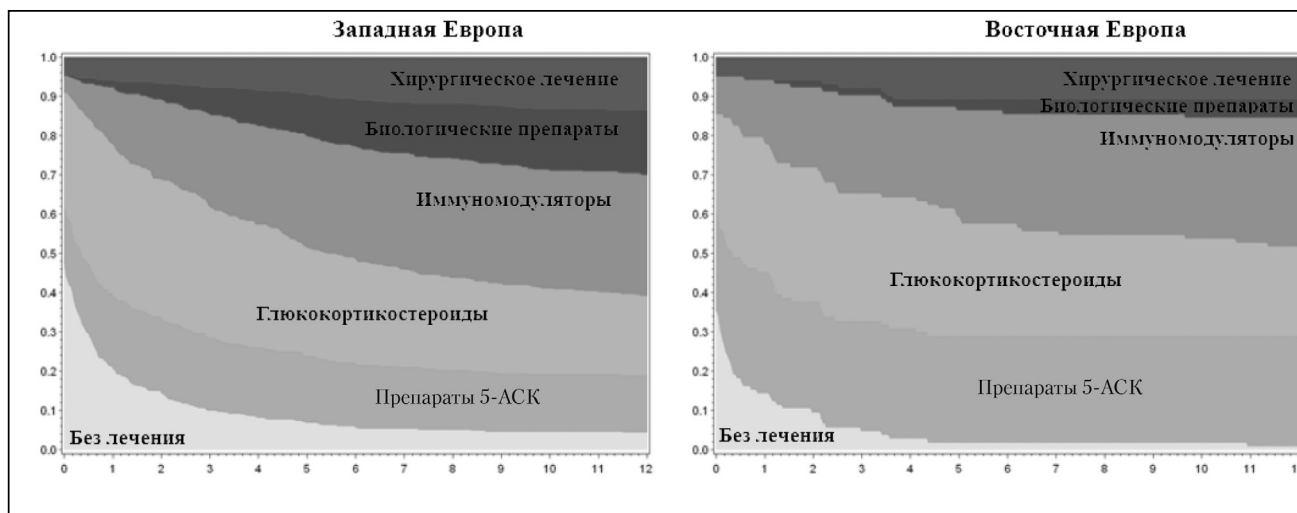


Рис. 2. Распределение пациентов с болезнью Крона, получающих различные виды лечения в течение первого года с момента установления диагноза ВЗК в Западной и Восточной Европе [2].

Здесь и на рис. 3: По оси абсцисс — доля пациентов в популяции; по оси ординат — время с момента установления диагноза, мес.

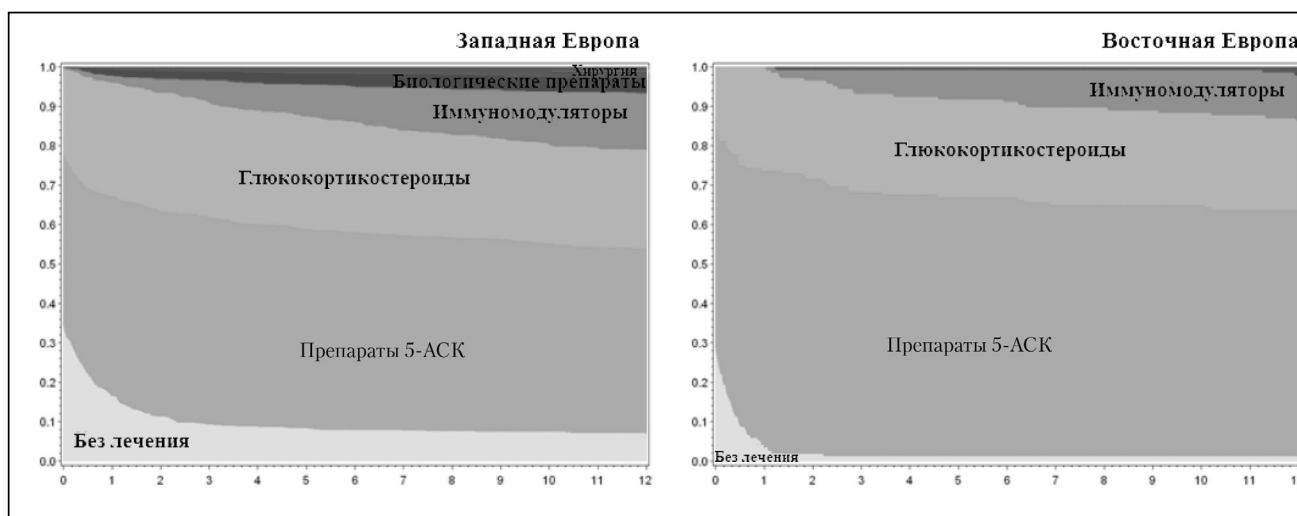


Рис. 3. Распределение пациентов с неспецифическим язвенным колитом, получающих различные виды лечения в течение первого года с момента установления диагноза ВЗК в Западной и Восточной Европе [1].

В настоящее время сложно представить, какие генетические маркеры будут использоваться для диагностики, прогнозирования эффективности, безопасности и индивидуализации фармакотерапии ВЗК. Вероятно, все-таки будут идентифицированы универсальные генетические предикторы

ЛИТЕРАТУРА

1. *Burisch J.* Crohn's disease and ulcerative colitis. Occurrence, course and prognosis during the first year of disease in a European population based inception cohort. *Dan Med J* 2014; 61 (1): B4778.
2. *Manninen P.* Inflammatory Bowel Diseases. An epidemiological survey with twenty-year follow-up. Academic dissertation. Tampere University Press. 121.
3. *Mamula P., Markowitz J., Baldassano R.N.* Inflammatory bowel disease in early childhood and adolescence: special considerations. *Gastroenterol Clin N Am* 2003; 32: 967—995.
4. *Яблокова Е.А., Горелов А.В., Чумакова О.В. и др.* Нарушение минерализации костной ткани у детей с воспалительными заболеваниями кишечника. *Вопросы современной педиатрии* 2006; 5 (4): 56—61. /

БК и ЯК. Вероятно, что значительные данные будут получены в результате эпигенетических исследований возможных изменений экспрессии генов и фенотипа клетки без изменений последовательности самой ДНК, а связанных с её метилированием или деацетилированием гистонов. Кто знает?!

5. *Jablokova E.A., Gorelov A.V., Chumakova O.V. i dr.* Narushenie mineralizatsii kostnoj tkani u detej s vospalitel'nymi zabolevanijami kishechnika. *Voprosy sovremennoj pediatrii* 2006; 5 (4): 56—61. [in Russian]
6. *Orel R.* Inflammatory bowel disease, intestinal microflora, prebiotics and probiotics. *International Journal of Sanitary Engineering Research* 2009; 3 (1): 36—48.
7. *Габрусская Т.В.* Генетические маркеры воспалительных заболеваний кишечника: роль в патогенезе. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга* 2009; 4: 7—10. / *Gabrusskaja T.V.* Geneticheskie markery vospalitel'nykh zabolevanij kishechnika: rol' v patogeneze. *Gastrojenterologija Sankt-Peterburga* 2009; 4: 7—10. [in Russian]
8. *Гастроэнтерология и гепатология: учебное пособие / С.С. Бацков; под редакцией С.С. Алексанина; Всерос центр экстрен и радиац медицины им. А.М.Никифорова МЧС России. СПб.: Политехника-*

- сервис, 2014; 260. / Gastroenterologija i hepatologija: uchebnoe posobie / S.S. Backov; pod redakciej S.S. Aleksanina; Vseros centr jekstren i radiac mediciny im. A.M.Nikiforova MChS Rossii. SPb.: Politehnika-servis, 2014; 260. [in Russian]
8. Zeissig S., Burgel N., Gunzel D. et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 61–72.
 9. Lees C.W., Satsangi J. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3 (5): 513–534.
 10. Actis G.C. The Changing Face of Inflammatory Bowel Disease: Etiology, Physiopathology, Epidemiology. *Ann Colorectal Res* 2016; 4 (1): e32942.
 11. Шукина О.Б. Факторы прогноза болезни Крона. Альманах клинической медицины 2014; 3 (33): 3–14. / Shhukina O.B. Faktory prognoza bolezni Krona. Al'manakh klinicheskoy mediciny 2014; 3 (33): 3–14. [in Russian]
 12. Von Stein P.L., Lofberg R., Kuznetsov N.V. et al. Multigene analysis can discriminate ulcerative colitis, Crohn's disease and irritable bowel syndrome. *Gastroenterol* 2008; 134: 1869–81.
 13. Pelloquin J.M., Goel G., Kong L. et al. Characterization of candidate genes in inflammatory bowel disease-associated risk loci. *JCI Insight* 2016; 1 (13): e87899.
 14. Аляутдин Р.Н., Романов Б.К. Доза определяет яд. Безопасность и риск фармакотерапии 2014; 3 (4): 5–10. / Aljautdin R.N., Romanov B.K. Doza opredeljaet jad. Bezopasnost' i risk farmakoterapii 2014; 3 (4): 5–10. [in Russian]
 15. Pithadia A.B., Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports* 2011; 63: 629–642.
 16. Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J. et al. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9: 29–42.
 17. Pierik M., Rutgeerts P., Vlietinck R., Vermeire S. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (23): 3657–3667.
 18. Mwinji J. Pharmacogenetics of nuclear receptors and drug transporters in inflammatory bowel disease and hepatic drug metabolism. University of Zurich, Faculty of Medicine. 2013.
 19. Кукес В.Г., Сычев Д.А., Бруслик Т. и др. Изучение транспортеров лекарственных средств как новая возможность персонализации фармакотерапии. *Врач* 2007; 5: 2–6. / Kukes V.G., Sychev D.A., Bruslik T. i dr. Izuchenie transporterov lekarstvennykh sredstv kak novaja vozmozhnost' personalizacii farmakoterapii. *Vrach* 2007; 5: 2–6. [in Russian]
 20. Khan K.J., Ullman T.A., Ford A.C. et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterology* 2011; 106 (4): 661–673.
 21. Журавлева М.В., Кукес В.Г., Прокофьев А.Б., Архипов В.В. и др. Эффективность и безопасность применения лекарственных средств: значение и возможности клинической фармакологии. *Вестник НЦЭСМП* 2015; 2: 20–24. / Zhuravleva M.V., Kukes V.G., Prokofev A.B., Arkhipov V.V. i dr. Jeffektivnost' i bezopasnost' primeneniya lekarstvennykh sredstv: znachenie i vozmozhnosti klinicheskoy farmakologii. *Vedomosti NCJeSMP* 2015; 2: 20–24. [in Russian]
 22. Корниенко Е.А., Крупина А.Н., Габрусская Т.В., Калинина Н.М. Воспалительные заболевания кишечника с очень ранним началом. Альманах клин. медицины 2016; 44 (6): 719–733. / Kornienko E.A., Krupina A.N., Gabrusskaja T.V., Kalinina N.M. Vospalitel'nye zabojevanija kishhechnika s ochen' rannim nachalom. Al'manakh klin mediciny 2016; 44 (6): 719–733. [in Russian]
 23. Uhlig H.H., Schwerdt T., Koletzko S. et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2014; 147 (5): 990–1007.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сереброва Светлана Юрьевна — д.м.н., главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Прокофьев Алексей Борисович — д.м.н., профессор, директор Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Журавлева Марина Владимировна — д.м.н., профессор, зам. директора Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Казаков Руслан Евгеньевич — начальник отдела Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Сичинава Ира Вениевна — профессор кафедры детских болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Городецкая Галина Ивановна — научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Еременко Наталья Николаевна — эксперт I категории Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Лазарева Наталья Борисовна — д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Галстян Лилит Ромаевна — аспирантка кафедры детских болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Смолярчук Елена Анатольевна — к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Кургузова Дарья Олеговна — ассистент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГБОУ ВО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Барков Антон Олегович — аспирант Института Фармации и трансляционной медицины Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Иммунологические нарушения при урогенитальной хламидийной инфекции и методы их коррекции

А. А. ХРЯНИН^{1,2}, О. В. РЕШЕТНИКОВ³

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск

² РОО «Ассоциация акушеров-гинекологов и дерматовенерологов», Новосибирск

³ ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», Новосибирск

Immunological Disorders in the Course of a Urogenital Chlamydial Infection and Methods of Their Correction

A. A. KHRYANIN^{1,3}, O.V. RESHETNIKOV²

¹ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

² Association of Obstetricians-gynecologists and Dermatovenereologists, Novosibirsk

³ Research institute of therapy and preventive medicine, Novosibirsk

При хроническом течении урогенитальной хламидийной инфекции отмечаются нарушения всех звеньев патогенеза, а также изменения состава и свойств биологически активных веществ, в том числе цитокинов, включая интерфероны. Предлагаются новые подходы, включая цитокины, особенно ИФН-гамма, который является наиболее важным в формировании общего иммунитета, включая его совместное сочетание с ИФН-альфа, -бета и -лямбда.

Ключевые слова: иммунологические нарушения, хламидийная инфекция, методы коррекции.

During the chronic urogenital chlamydial infection, violations of all links of pathogenesis, as well as changes in the composition and properties of biologically active substances, i.d. cytokines, including interferons, are noted. The authors suggest novel approaches, including cytokines, especially IFN-gamma, which is the most important in the formation of general immunity, including its combination with IFN-alpha, -beta, and lambda.

Keywords: immunological disorders, chlamydial infection, methods of correction.

Chlamydia trachomatis является основным этиологическим агентом воспалительных заболеваний органов малого таза, хроническое течение которых оказывает неблагоприятное влияние на репродуктивное здоровье и вызывает ряд серьёзных осложнений: вторичное бесплодие, внематочную и прерванную беременность, эпидидимиты, простатиты и др. [1–4].

Важно отметить, что частота невынашивания беременности в популяции составляет 15–25% [5], а неразвивающаяся беременность среди случаев самопроизвольных выкидышей на ранних сроках составляет 24,5–28,6% [6, 7]. Наличие генитальной инфекции — основная причина подобных осложнений [8, 9]. Известно, что хроническое течение хламидийной инфекции приводит к нарушению экспрессии прогестероновых рецепторов и к снижению чувствительности к прогестерону. Под воздействием инфекционного агента стимулируется продукция провоспалительных

цитокинов, а также повышается выработка простагландинов и, как следствие, происходит размягчение шейки матки [10]. Патогенетический механизм воздействия инфекционного агента при неразвивающейся беременности представлен на рис. 1 [11].

В настоящее время широко изучается роль антигенов *C.trachomatis* в возникновении иммунопатологических реакций. В первую очередь внимание привлекают белки теплового шока (heat shock protein). Установлено, что наличие антител к hsp60 и hsp70 у женщин ассоциируется с трубным бесплодием. Сам hsp60, являясь гомологом белка *E.coli* GroEL, принимает участие в иммунопатогенезе персистирующей инфекции и поддержании постоянной воспалительной реакции при урогенитальном хламидиозе (УГХ). Это влечёт за собой антигенную перегрузку организма и запуск вторичного гуморального ответа с гиперпродукцией антител класса IgM и IgG к *C.trachomatis*, а также активацию реакции гиперчувствительности замедленного типа, обуславливая инфильтрацию слизистых оболочек лимфоцитами и моноцитами. Hsp60 стимулирует запуск аутоиммунного пере-

© А. А. Хрянин, О. В. Решетников, 2017

Адрес для корреспонденции: 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52. Новосибирский государственный медицинский университет. E-mail: khryanin@mail.ru



Рис. 1. Механизм воздействия инфекционного агента [11]

крестного ответа, так как является подобием белков эукариотов, что приводит к эффекту теплового шока у клетки-хозяина и вызывает развитие стресс-реакции у микроорганизма, проявлением которой является остановка клеточного цикла на стадии ретикулярного тельца. Увеличение hsp60 при патологии способствует появлению цитокинов воспаления, индуцирует синтез металлопротеиназ и окисление липопротеинов и др. Каждое из этих событий напрямую связано с участием hsp60 в развитии хронических заболеваний либо за счёт непосредственной антигенной стимуляции, либо индуцирования активации макрофагов. Повышенный уровень стимуляции *C. trachomatis* антигенов, имеющий место при реинфекции или персистирующей инфекции, приводит к хроническому воспалению и рубцеванию тканей и может играть роль в патогенезе повреждения эндометрия и маточных труб у женщин при УГХ [12].

Возникла необходимость комплексного изучения урогенитального хламидиоза с точки зрения общего инфекционного воспалительного процесса, выяснения патогенетических факторов, способствующих развитию хронических форм заболевания. Результаты некоторых исследований свидетельствуют о нарушении функций иммунной системы при УГХ [12–19]. Однако участие иммунной системы в формировании хронического патологического процесса при УГХ остаётся дискуссионным. Не уточнён вопрос о механизмах регуляции иммунопатологического ответа организма на инфицирование *C. trachomatis*.

Цель исследования — выявить характер иммунологических нарушений (по уровню циркулиру-

ющих иммунных комплексов, γ -интерферона (ИФН), интерлейкинов-1 β , 4, 6 и лактоферрина) у больных УГХ.

Материал и методы

В исследование были включены 84 больных УГХ (51 мужчина и 33 женщины, средний возраст $35 \pm 0,47$ лет) и 32 практически здоровых человека (контрольная группа). Диагноз УГХ верифицировался с учётом положительных результатов лабораторной диагностики методом ПЦР («АмплиСенс», ЦНИИЭ МЗ РФ, Москва).

Степень выраженности иммунных нарушений при инфекционном воспалении у больных УГХ оценивалась с помощью специальных методов исследования.

Характер иммунопатологических реакций и состояние системы протеиназы/антипротеиназы оценивали по уровням γ -интерферона (γ -ИНФ), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-6 (ИЛ-6), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), лактоферрина (ЛФ) и α 2-макроглобулина (α 2-МГ) в сыворотке крови, анализируемых с помощью иммуноферментных и биохимических методов: определение содержания ЦИК проводили методом жидкостной преципитации 4% ПЭГ-600 [20]; содержание α 2-МГ проводили согласно методики предложенной К.Н. Веремеенко [21]; содержание уровня ЛФ проводили с помощью тест-системы «ЛАКТОФЕРРИН-стрип D-4106» (ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская область, Россия); уровень γ -ИНФ определялся с помощью тест-системы « γ -Интерферон-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская область, Россия); уровень ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6 определялся с помощью тест-систем «ProCon ИЛ-1 β », «ProCon ИЛ-4», «ProCon ИЛ-6» (ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург, Россия).

Статистическая обработка полученных данных выполнена с помощью статистической программы SPSS 6.0. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Отношение шансов (OR) с доверительными интервалами (95% CI) рассчитывали по таблице сопряжённости. Критерием статистической достоверности был уровень $p=0,05$.

Содержание ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6 в сыворотке крови у практически здоровых и больных УГХ (M $\pm$ m)

Показатели	Практически здоровые (n=32)	Больные УГХ (n=84)
ИЛ-1 β , пг/мл	38,9 $\pm$ 3,97	121,5 $\pm$ 10,98**
ИЛ-6, пг/мл	19,5 $\pm$ 4,78	41,6 $\pm$ 3,42**
ИЛ-4, пг/мл	48,1 $\pm$ 6,75	79,57 $\pm$ 11,92*

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

При изучении иммунологических показателей было обнаружено, что уровень ЦИК в сыворотке крови у больных УГХ значимо выше нормативных показателей. Формирование ЦИК (комплекс антиген-антитело) является закономерным компонентом любого инфекционного процесса, направленным на нейтрализацию антигена различного происхождения [12]. У больных УГХ усиливаются аутоиммунные реакции, что отразилось в достоверном ($p < 0,05$) увеличении в 1,83 раза уровня ЦИК в сыворотке крови по сравнению с практически здоровыми лицами (соответственно 106,1 5,12 и 57,8 $\pm$ 3,39 усл. ед., $p < 0,05$).

Высокое содержание ЦИК в крови больных УГХ, по всей вероятности, может свидетельствовать о выраженном иммунологическом напряжении на уровне целого организма и отражать функциональное состояние молекулярно-клеточных механизмов иммунной защиты.

Одним из таких молекулярных механизмов, регулирующих активность клеток иммунной системы, являются цитокины [22], среди которых особую роль в антихламидийном иммунитете отводят γ -ИНФ [19, 23].

Анализ содержания γ -ИНФ показал, что его уровень в сыворотке крови больных УГХ в 1,64 раза ниже, чем у практически здоровых лиц (соответственно 28,9 $\pm$ 4,15 и 47,3 $\pm$ 4,26 пг/мл, $p < 0,05$).

Большой интерес для понимания патогенеза воспалительного процесса, обусловленного *C. trachomatis*, и особенностей иммунной регуляции при нём представляет рассмотрение баланса интерлейкинов в организме больных УГХ. Причём такую оценку целесообразно проводить с учётом возможной патогенетической значимости интерлейкинов, основываясь на их провоспалительных и противовоспалительных свойствах [12].

Содержание ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6 в сыворотке крови у практически здоровых и больных УГХ представлены в таблице.

Уровень провоспалительного ИЛ-1 β в сыворотке крови больных УГХ в 3,12 раза выше по сравнению с практически здоровыми лицами. Аналогичная закономерность отмечается и для ИЛ-6, содержание которого в крови у больных УГХ было увеличено в 2,13 раза ($p < 0,001$). Уровень противовоспалительного ИЛ-4 в сыворотке крови у больных УГХ был достоверно выше в 1,65

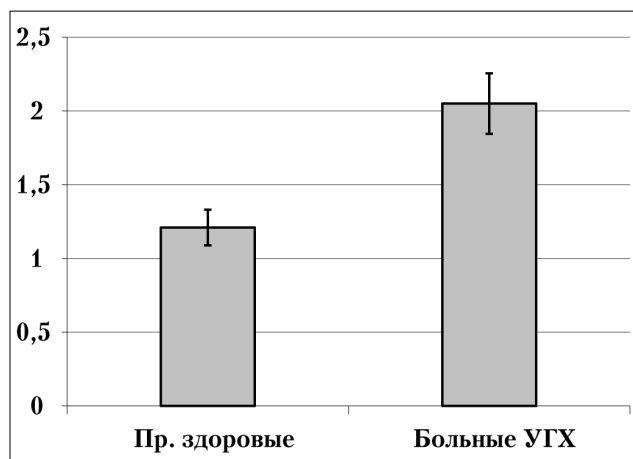


Рис. 2. Соотношение [ИЛ-1 β + ИЛ-6] / [ИЛ-4] у практически здоровых и больных УГХ ($p < 0,05$).

раза по сравнению с практически здоровыми лицами ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии дисбаланса в продукции цитокинов Th-1 и Th-2 типов в организме при хронической хламидийной инфекции, со смещением синтеза интерлейкинов в сторону провоспалительных видов.

Более наглядно это можно представить при расчёте коэффициентов соотношений [ИЛ-1 β + ИЛ-6] / [ИЛ-4] в норме и патологии (рис. 2).

Плейотропность цитокинов и их активное участие во взаимоотношениях иммуокомпетентных клеток с гомеостатическими системами при *C. trachomatis* во многом определяет состояние общих механизмов противoinфекционной защиты организма. В частности, это может быть связано с активностью нейтрофильных гранулоцитов крови, с их способностью синтезировать ЛФ, обладающего высоким антипаразитарным, антивирусным и антибактериальным действием, а также способного выступать в качестве протеазного ингибитора и прокоагулянтного фактора [24].

При анализе уровня ЛФ было установлено, что его содержание в сыворотке крови больных УГХ достоверно превышает в 2,37 раза аналогичный.

Высокий уровень ЛФ, по всей вероятности, может являться отражением активности местного воспаления при *C. trachomatis*. Данные корреляционного анализа косвенно подтвердили это, засвидетельствовав наличие тесных положитель-

ных связей между уровнем ИЛ-1 и ЛФ ($r=+0,67$, $p<0,05$), ИЛ-6 и ЛФ ($r=+0,59$, $p<0,05$) в крови у больных УГХ.

При трактовке полученных результатов необходимо было учитывать тот факт, что высокое содержание цитокинов в организме при воспалении может быть связано не только с высокой активностью иммунокомпетентных клеток противоинфекционной защиты (В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, макрофагов и др.), но и с целым рядом метаболических процессов, в том числе в системе протеолитических ферментов/антипротеазы. Установлено, что $\alpha 2$ -МГ принимает активное участие в регуляции цитокинов [25, 26], поэтому представляется интересным оценка его уровня в крови у больных УГХ.

При анализе содержания $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови больных УГХ было установлено, что его величина достоверно, в 1,36 раза, превышает аналогичные величины в группе практически здоровых лиц ($2,59\pm 0,21$ мг/л и $1,9\pm 0,47$ мг/л, $p<0,001$).

В настоящее время известно, что $\alpha 2$ -МГ влияет на многие реакции системы иммунитета: тормозит ответ клеток на воздействие ряда мутагенов, связывает ионы металлов, липополисахариды, стимулирует лимфоцитоз и гранулоцитоз, но одной из главных функций является его неспецифическая протеазо-связывающая способность [26, 27].

Известно, что экзогенные протеиназы, взаимодействуя в крови с $\alpha 2$ -МГ, могут влиять на метаболизм биологически активных пептидов, выделяющихся в очаге воспаления (брадикинин, лейкокинины, интерлейкины и др.). Последние накапливаются в месте повреждения тканей, вызывая повышение проницаемости сосудов и миграцию лейкоцитов [28, 29]. Протеолитические ферменты в комплексе с $\alpha 2$ -МГ способны расщеплять эти пептиды в очаге воспаления.

Таким образом, высокий уровень $\alpha 2$ -макроглобулина в крови больных УГХ является отражением патологического изменения динамического равновесия в системе протеиназы/антипротеиназы, что способствует нарушению регуляции цитокинов и активности протеолитических реакций в организме.

Считается, что ведущую роль в патогенезе *C.trachomatis* играют иммунопатологические механизмы [12—18, 30—31]. Обобщая исследования по вопросам иммунопатологических механизмов развития *C.trachomatis* в организме человека от локального воспаления до системного ответа, можно в общих чертах представить единую схему патогенеза УГХ, что представляет не только научный интерес, но и позволяет определить ряд важных положений, необходимых в разработке патогенетически обоснованной терапии.

Из-за способности *C.trachomatis* ингибировать слияние фагосом с лизосомами фагоцитоз при

УГХ считается непродуктивным, поскольку рост *C.trachomatis* в моноцитах приостанавливается в промежуточном состоянии на стадии между элементарными и ретикулярными тельцами. На этом этапе в цитоплазме моноцитов обнаруживается липополисахарид клеточной стенки и отсутствует основной белок наружной мембраны (Momp) *C.trachomatis* [12—18, 30—31]. Макрофаги предъявляют Т-хелперам липополисахаридный антиген и не предъявляют основной протективный антиген *C.trachomatis* Momp. Следовательно, иммунный ответ формируется на вариабельный липополисахарид и оказывается неспецифическим по отношению к *C.trachomatis*.

Развитие противоинфекционных реакций организма в ответ на внедрение *C.trachomatis* включает в себя несколько этапов: распознавание антигена, его презентацию, индукцию гуморального иммунного ответа, активацию Т-лимфоцитов (CD4 и CD8) и моноцитов/макрофагов, миграцию иммунных клеток, контролируемую различными цитокиновыми реакциями [12—18, 30—31].

Вся совокупность клеточных реакций элиминации антигена, вовлекающих макрофаги, Т-лимфоциты и нейтрофильные фагоциты, при которых нет необходимости в пролиферации и дифференцировке Т-лимфоцитов, может считаться первой фазой иммунного ответа. Она тесно связана со следующей — второй фазой, которая начинается на уровне пролиферирующих Т-лимфоцитов и определяет основное направление в последующих реакциях организма на патоген, когда начинают включаться клеточные или гуморальные пути иммуногенеза. Первая фаза иммунного ответа постоянно функционирует и является, по-видимому, основной немедленной реакцией организма при невысоких нагрузках патогена. Она включается сразу же после распознавания антигена. Её участниками являются иммунные эффекторы, дифференцированные к данному моменту, но, с другой стороны, именно она создает базис для последующих иммунных реакций. Вторая фаза начинается с пролиферации и дифференцировки Th лимфоцитов (CD4) на субпопуляции, регулирующие, главным образом, клеточные (Th-1) или гуморальные (Th-2) реакции иммунитета, и развивается позднее [29].

Первая фаза специфического защитного иммунного ответа начинается с активации целого комплекса цитокинов (интерлейкинов, интерферонов, молекул адгезии и др.), то есть в целом характеризуется активацией моноцитарно-макрофагальной фазы. Особая значимость в этой фазе придаётся состоянию провоспалительных интерлейкинов и, в частности, ИЛ-1 [28]. Индукция синтеза ИЛ-1 при УГХ может быть вызвана целым рядом биологически активных веществ, главными из которых являются компоненты кле-

точных стенок *C.trachomatis* [31]. В продукции ИЛ-1 принимают участие до 90% моноцитов периферической крови человека и до 40—60% тканевых макрофагов [28].

Полученные данные свидетельствуют, что содержание ИЛ-1 β в сыворотке крови у больных УГХ значительно превышает аналогичные параметры у практически здоровых людей. Следовательно, формирование хронических иммунопатологических процессов у человека при УГХ может сопровождаться повышением уровня ИЛ-1 β вследствие активации иммунной системы. ИЛ-1 является главным медиатором развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма.

Именно с этой точки зрения становится понятным всё его, на первый взгляд необъяснимое, разнообразие биологических функций при УГХ: стимуляция развития целого комплекса защитных реакций организма, направленных на ограничение распространения инфекции, элиминацию внедрившихся микроорганизмов и восстановление целостности повреждённых тканей. Конечно, эти реакции чрезвычайно сложны и многообразны.

В регуляции воспалительного ответа принимают участие помимо ИЛ-1 и другие цитокины, а также биологически активные вещества, с которыми действие ИЛ-1 тесно связано. За счёт конститутивной экспрессии своих рецепторов ИЛ-1 очень быстро активирует практически все типы клеток, участвующих в формировании локальной воспалительной реакции, включая фибробласты, эндотелий, резидентные макрофаги и все типы лейкоцитов крови [28]. Помимо стимуляции выхода нейтрофилов в очаг воспаления, он вызывает их активацию, усиливая адгезию, хемотаксис, фагоцитоз и продукцию свободных форм кислорода. Подтверждением активации нейтрофильных гранулоцитов периферической крови являются собственные данные о достоверном увеличении содержания ЛФ в сыворотке крови у больных УГХ в 2,37 раза по сравнению с аналогичным показателем в группе практически здоровых лиц. Данные корреляционного анализа засвидетельствовали наличие значимой положительной связи между уровнем ИЛ-1 и ЛФ ($r=+0,67$) при УГХ.

Важнейшее свойство ИЛ-1 — стимуляция пролиферации преактивированных антигеном зрелых Т-лимфоцитов. ИЛ-1 может усиливать пролиферацию обоих типов Th клонов, но сам ИЛ-1 не является ростовым фактором Т-лимфоцитов. Его действие заключается в индукции синтеза специфических ростовых факторов, в первую очередь ИЛ-2 и ИЛ-4, и усилении экспрессии их рецепторов. Лимфоцитактивирующее действие ИЛ-1 распространяется и на В-лимфоциты [28]. Это является необходимым для последующего

развития специфической фазы иммунного ответа при УГХ.

Иммунный ответ организма при *C.trachomatis* носит преимущественно Th-1 характер, ему принадлежит решающая роль в выздоровлении [30, 31]. Чрезвычайно важным компонентом этого является γ -ИФН, стимулирующий экспрессию целого ряда молекул, необходимых для развития специфического защитного иммунного ответа при УГХ. Анализ содержания γ -ИФН показал, что его уровень в сыворотке крови больных УГХ в 1,64 раза ниже, чем у практически здоровых лиц. Хотя известно, что высокие уровни γ -ИНФ ингибируют рост *C.trachomatis*, а низкие — наоборот, индуцируют развитие морфологически aberrantных форм включений [32—34].

С позиций сегодняшнего дня можно утверждать, что активация неспецифических клеточных реакций иммунитета и регуляция эффекторов в иммунном ответе, по-видимому, является основной функцией γ -ИФН в организме при УГХ. Это связано с его способностями усиливать экспрессию антигенов клеточных мембран *C.trachomatis*, включая антигены главного комплекса гистосовместимости I и II классов, Fc-рецепторы, что приводит к активации не только макрофагов, но и фибробластов и эпителиальных клеток, а также происходит стимуляция синтеза ИЛ-1, ИЛ-2 и Ig [16—18]. Повышенный синтез γ -ИФН ингибирует дифференцировку и пролиферацию Th2, приводя к доминированию ответа Th-1, а ИЛ-4 совместно с ИЛ-10 угнетает продукцию γ -ИФН Th-1, что приводит к преобладанию ответа Th2.

В целом, можно сказать, что уровни цитокинов в сыворотке крови отражают текущее состояние работы иммунной системы и развития защитных реакций, т.е. синтез цитокинов клетками организма *in vivo*. В то же время цитокиновый дисбаланс между Th1 и Th2 определяет направление нарушений иммунного ответа при *C.trachomatis* [16—18].

Полученные данные свидетельствуют о значительном повышении у больных УГХ концентраций основных провоспалительных интерлейкинов по сравнению с противовоспалительными интерлейкинами и нормативными значениями. Так, если уровень ИЛ-1 β и ИЛ-6 в сыворотке крови больных УГХ был в 2—3 раза выше нормы, то прирост ИЛ-4 составил всего лишь 65,4%. Аналогичная закономерность в дисбалансе Th-1 и Th-2 типов цитокинов в организме при хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях органов репродукции отмечается целым рядом исследователей [16—18].

Определение механизмов иммунитета путём комбинации антител и CD4 (+) Т-клеток является основой для разработки эффективной антихламидийной вакцины. Использование *C.muridarum* ин-

фекции на модели мышей, которая воспроизводит многие черты инфекции *C.trachomatis* у человека, ранее продемонстрировало существенную роль γ -ИФН при создании иммунитета к хламидийной инфекции. Оказалось, что одни только антитела не обладают защитным эффектом. Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что антитело-опосредуемый иммунитет, по крайней мере в отношении *C.trachomatis*, зависит от активации популяции эффекторных CD4 (+) Т-клеток в тканях половых путей. Одним из ключевых компонентов защитной реакции антител является γ -ИФН, причём его протективная функция не зависит от класса иммуноглобулинов [16].

В молекулярно-генетическом исследовании был определен однонуклеотидный полиморфизм гена, кодирующего синтез γ -ИФН (rs2430561) в позиции +874 в гене у женщин, обратившихся к гинекологу. Т-аллельный вариант, связанный с повышенным уровнем продукции γ -ИФН, обнаружен у 36,2% *C.trachomatis*-негативных женщин, в отличие от 18,4% у женщин, которые инфицированы этим микроорганизмом ($p=0,0415$). Таким образом, наличие аллеля Т в положении +874 в гене, кодирующем γ -ИФН, связано с уменьшенной вероятностью хламидийной инфекции шейки матки [17].

В недавнем обзоре, посвящённом иммунитету, иммунопатологии и современным проблемам разработки вакцины против передающейся половым путём *C.trachomatis* показано, что защитный иммунитет к хламидийной инфекции в значительной степени опосредован активностью Th1 Т-клеток, продуцирующих γ -ИФН, который необходим, чтобы предотвратить распространение инфекции [18].

В связи с этим перспективным является использование γ -ИФН у больных с УГХ в комплексной патогенетической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and Estimates. Geneva: WHO, 2010.
2. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. MMWR. Recommend and Reports 2015; 64: 3 : 78–82.
3. European Guideline for the Management of Pelvic Inflammatory Disease. http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2015/PID_Treatment_GuidelinesEurope2015v5.pdf.
4. Хрянин А.А., Решетников О.В. Хламидийная инфекция: от науки к практике. Киев, Издательство ООО Тетрис-принт, 2012; 180. / *Khrjanin A.A., Reshetnikov O.V. Khlamidiynaya infekcija: ot nauki k praktike*. Kiev, Izdatel'stvo ООО Tetris-print, 2012; 180. [in Russian]
5. Кулаков В.И., Серов В.Н., Абакарова П.Р. и др. Рациональная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии: Рук. для практикующих врачей / Под общ. ред. В.И. Кулакова, В.Н. Серова. М.: Литтерра, 2006; 1152. / *Kulakov V.I., Serov V.N., Abakarova P.R. i dr. Racional'naja farmakoterapija v aku-sherstve i ginekologii: Ruk. dlja praktikujushhikh vrachej* / Pod obshh. red. V.I. Kulako-va, V.N. Serova. M.: Litterra, 2006; 1152. [in Russian]
6. Акушерство: национальное руководство / Под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, В.Н. Серова, В.Е. Радзинского. 2-е изд. Перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. / *Akusherstvo: nacional'noe rukovodstvo* / Pod red. G.M. Savel'evoy, G.T. Sukhikh, V.N. Serova, V.E. Radzinskogo. 2-e izd. Pererab. i dop. M.: GJeOTAR-Media, 2015. [in Russian]

В настоящее время препараты на основе γ -ИФН производятся всего в трёх странах: США, Германии и России.

Отечественный инновационный препарат на основе рекомбинантного человеческого γ -ИФН зарегистрирован под торговым названием Ингарон. Главным преимуществом рекомбинантных ИФН (в отличие от лейкоцитарных), является то, что Ингарон получен в результате микробиологического синтеза в рекомбинантном штамме *E.coli* и очищен колоночной хроматографией. Поэтому Ингарон является биологически чистым препаратом.

На данный момент Ингарон является единственным препаратом на основе γ -ИФН в РФ и выпускается в двух лекарственных формах: интраназальной и инъекционной. Согласно инструкции к применению, при УГХ рекомендовано применение ИФН системного действия — γ -ИФН по 500 000 МЕ 1 раз в сутки подкожно через день, на курс — 5 инъекций в комплексной терапии.

Таким образом, препарат Ингарон является наиболее важным и ответственным в лечении, профилактике и, самое главное, в использовании и при разработке новых методов и программ новых подходов к современным методикам при разработке вакцины против *C.trachomatis*.

В заключение, следует отметить, что наиболее важными функциями цитокинов являются локальная паракринная и аутокринная регуляция клеток. Совпадение условий включения секреции провоспалительных цитокинов и усиления экспрессии рецепторов на клетках-мишенях обеспечивает локальный характер действия цитокинов. Только при длительном воспалительном процессе в крови происходит накопление провоспалительных цитокинов, которые могут влиять на клетки дистантных органов.

7. Ранние сроки беременности / Под ред. В.Е. Радзинского и соавт. М.: StatusPraesens, 2009. / *Rannie sroki beremennosti* / Pod red. V.E. Radzinskogo i soavt. M.: StatusPraesens, 2009. [in Russian]
8. Хрянин А.А., Решетников О.В., Кривенчук Н.А., Гушин А.Е., Алаева О.А. Хламидиоз у женщин: сопоставление разных методов диагностики, факторы риска и клинические проявления. Вест дерматол венерол 2006; 2: 40–43. / *Khrjanin A.A., Reshetnikov O.V., Krivenchuk N.A., Gushhin A.E., Alaeva O.A. Khlamidioz u zhenshhin: sopostavlenie raznykh metodov diagnostiki, faktory riska i klinicheskie proyavleniya*. Vest dermatol venerol 2006; 2: 40–43. [in Russian]
9. Хрянин А.А., Решетников О.В. Распространённость вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов в Сибири: популяционное исследование. Росс журн кож вен бол 2008; 1: 9–13. / *Khrjanin A.A., Reshetnikov O.V. Rasprostranennost' virusa prostogo herpesa 1-go i 2-go tipov v Sibiri: populyacionnoe issledovanie*. Ross zhurn kozh ven bol 2008; 1: 9–13. [in Russian]
10. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. М.: Триада-Х, 2005; 304. / *Sidel'nikova V.M. Privychnaja poterja beremennosti*. M.: Triada-Kh, 2005; 304. [in Russian]
11. Кузьмин В.Н., Мурривева Г.А. Роль неспецифических урогенитальных инфекций в патогенезе самопроизвольных преждевременных родов. Лечащий врач 2013; 6: 60–62. / *Kuz'min V.N., Murrieva G.A. Rol' nespecificheskikh urogenital'nykh infekcij v pa-togeneze samoproizvol'nykh prezhevremennykh rodov*. Lechashhij vrach 2013; 6: 60–62. [in Russian]
12. Хрянин А.А., Сафронов И.Д., Ефремов А.В. Иммунологические нарушения при хроническом течении урогенитальной хламидийной инфекции. Росс журн кож вен бол 2009; 2: 71–75. / *Khrjanin A.A.,*

- Safronov I.D., Efremov A.V. Immunologicheskie narusheniya pri khronicheskom techenii urogenital'noj khlamidijnoj infekcii. Ross zhurn kozh ven bol 2009; 2: 71—75. [in Russian]
13. Beatty W.L., Morrison R.P., Byrne G.I. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. Microbiol Rev 1994; 58: 686—699.
 14. Brunham R.C. Human immunity to chlamydiae. In R. S. Stephens (ed.), Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity. ASM Press, Washington, D.C., 1999; 211—238.
 15. Levine W.C., Pope V., Tambe P. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. J Infect Dis 1999; 177:167—174.
 16. Naglak E.K., Morrison S.G., Morrison R.P. IFN γ is required for optimal antibody-mediated immunity against genital Chlamydia infection. Infect Immun. 2016; 84 (11): 3232–3242.
 17. Eleutério J.Jr., Teles R.A., Linhares I.M., Normand N., Witkin S.S. Interferon-gamma gene polymorphism influences the frequency of a Chlamydia trachomatis cervical infection in young women. Int J STD AIDS. 2015; 26(13): 960—964. doi: 10.1177/0956462414563627.
 18. Rey-Ladino J., Ross A.G., Cripps A.W. Immunity, immunopathology, and human vaccine development against sexually transmitted Chlamydia trachomatis. Hum Vaccin Immunother. 2014; 10(9): 2664—2673. doi: 10.4161/hv.29683
 19. Хрянин А.А., Решетников О.В. Интерферон-гамма: новые горизонты терапии. Антибиотики и химиотер 2016; 3—4: 3—8. / Khrjanin A.A., Reshetnikov O.V. Interferon-gamma: novye gorizonty terapii, Antibiotiki i khimioter 2016; 3—4: 3—8. [in Russian]
 20. Константинова Н.А., Лаврентьев В.В., Побединская Л.К. Определение концентрации и молекулярной массы циркулирующих иммунных комплексов. Лаб дело 1986; 3: 161—164. / Konstantinova N.A., Lavrent'ev V.V., Pobedinskaja L.K. Opredelenie koncentracii i molekulyarnoy massy cirkulirujushchikh immunnykh kompleksov. Lab delo 1986; 3: 161—164. [in Russian]
 21. Веремеенко Н.К., Волохонская Л.И. Определение α 2-макроглобулина в сыворотке крови человека и его клиническое значение. Лаб дело 1969; 7: 394—397. / Veremeenko N.K., Volokhonskaja L.I. Opredelenie α 2-makroglobulina v syvorotke krovi cheloveka i ego klinicheskoe znachenie. Lab delo 1969; 7: 394—397. [in Russian]
 22. Кашкин К.П. Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунологическая активность: лекция. Клиническая лабораторная диагностика 1998; 11: 21—32. / Kashkin K.P. Citokiny immunoj sistemy: osnovnye svojstva i immunologicheskaja aktivnost': lekcija. Klin lab diagn 1998; 11: 21—32. [in Russian]
 23. Loomis W.P., Starnbach M.N. T cell responses to Chlamydia trachomatis. Curr Opin Microbiol 2002; 5: 87—91.
 24. Brock J.H. The physiology of lactoferrin. Biochem Cell Biol 2002; 80: 1—6.
 25. James K. Interactions between cytokines and alpha 2-macroglobulin. Immunol Today 1990; 11: 163–166.
 26. LaMarre J., Wollenberg G.K., Gonias S.L., Hayes M.A. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha 2-macroglobulins. Lab Invest 1991; 65: 3—14.
 27. LaMarre J., Wolf B.B., Kittler E.L. et al. Regulation of macrophage alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon-gamma. J Clin Invest 1993; 91: 1219—1224.
 28. Симбирцев А.С. Биология семейства интерлейкина-1 человека. Иммунология 1998; 3: 9—17. / Simbircev A.S. Biologija semejstva interlejkina-1 cheloveka. Immunologija 1998; 3: 9—17. [in Russian]
 29. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы её функционирования в норме и при патологии. Иммунология 1997; 5: 7—14. / Jarilin A.A. Sistema citokinov i principy ee funkcionirovanija v norme i pri patologii. Immunologija 1997; 5: 7—14. [in Russian]
 30. Mabey D.C. Immunology of chlamydial infections. In Pros Meet Eur Soc Chlam Res Helsinki 2000; 157—160.
 31. Yang X. Role of cytokines in Chlamydia trachomatis protective immunity and immunopathology. Curr Pharm Des 2003; 9: 67—73.
 32. Ito J.I., Lyons J.M. Role of gamma interferon in controlling murine chlamydial genital tract infection. Infect Immun 1999; 67: 5518—5521.
 33. Morrison R.P. Differential sensitivities of Chlamydia trachomatis strains to inhibitory effects of gamma interferon. Infect Immun 2000; 68: 6038—6040.
 34. Perry L.L., Feilzer K., Caldwell H.D. Immunity to Chlamydia trachomatis is mediated by T helper 1 cells through IFN- γ -dependent and -independent pathways. J Immunol 1997; 8: 344—3352.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хрянин Алексей Алексеевич — д.м.н., профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; вице-президент РОО «Ассоциация акушеров-гинекологов и дерматовенерологов», Новосибирск. SPIN-код автора в РИНЦ: 4311-2475

Решетников Олег Вадимович — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», Новосибирск. SPIN-код автора в РИНЦ: 6837-8271

Исторические аспекты лечения кожного лейшманиоза

*Ю. К. КУЗНЕЦОВА, В. П. СЕРГЕЕВ, К. Ю. КЫЗЫ КУЗНЕЦОВА

НИИ медицинский паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского Первого московского государственного медицинского университета, Москва

Historical Aspects of the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis

YU. K. KUZNETSOVA, V. P. SERGEEV, K. YU. QIZI KUZNETSOVA

I. M. Sechenov First Moscow State University, E. I. Martynovskii Institute of Medical Parasitology and Tropical Medicine, Moscow

Представлены исторические аспекты лечения кожного лейшманиоза. Данные литературы о лечении кожного лейшманиоза до 30 годов прошлого столетия свидетельствуют о попытках химиотерапии заболевания разнообразными средствами. В арсенале народных знахарей существовали целые группы средств и различные схемы лечения. В настоящем обзоре подробно освещены средства терапии кожного лейшманиоза, существовавшие на территории Царской России и бывшего СССР с давних времен по настоящее время.

Ключевые слова: кожный лейшманиоз, пендинская язва, болезнь Боровского, лечение лейшманиоза.

The article presents historical aspects of the treatment of cutaneous leishmaniasis. The literature data on the treatment of cutaneous leishmaniasis before the 30s of the last century testify to the attempts of chemotherapy of the disease by various means. There were entire groups of means and various treatment regimens in the arsenal of folk healers. This review highlights the treatment of cutaneous leishmaniasis, which existed in the territory of Imperial Russia and the former USSR from ancient times to the present.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, pendin ulcer, Borovsky's disease, treatment of leishmaniasis.

Кожный лейшманиоз (КЛ) — наиболее распространенная форма болезни, сопровождающийся повреждениями кожи в виде язв на открытых участках тела, после которых на всю жизнь остаются шрамы. Около 95% случаев заболевания отмечаются в Америке, в Средиземноморском бассейне, на Ближнем Востоке и в Средней Азии. Более двух третей новых случаев приходится на 6 стран: Алжир, Афганистан, Бразилию, Иран, Колумбию и Сирию. По оценкам, в мире ежегодно происходит от 0,7 до 1,3 млн новых случаев заболевания. Слизисто-кожный лейшманиоз приводит к тяжёлым формам инвалидности с частичным или полным разрушением слизистых оболочек носа, рта и горла. Около 90% случаев заболевания зарегистрированы в Боливии, Бразилии и Перу [1].

За последние 4 года в Российской Федерации (с 2011 по 2014 гг.) было зарегистрировано 23 случая лейшманиоза. Завозные случаи лейшманиоза зарегистрированы из Азербайджана, Армении, Грузии, Кыргызстана, Таджикистана, Узбекистана [2]. По данным ФМС России, в 2008 г. на миграционный учёт было поставлено около

9 млн иностранных граждан, в основном из стран СНГ. По некоторым оценкам, общая численность работающих в России иностранцев достигает 10—12 млн человек, включая нелегальную составляющую [1].

Кожный лейшманиоз был известен с глубокой древности, описание безболезненных язв, появляющихся после купания или укуса мухи, имеются в книге Яджур-Вег (IV век до нашей эры) [3]. По Л. Л. Гейденрейху, кожный лейшманиоз был распространён в войсках персов, ассирийцев и греков [4]. Первые достоверные литературные данные о кожном лейшманиозе относятся к 1745 г., когда, после своего путешествия по Сирии, англичанин Richard Pococke (A Description of the East and Some other Countries) познакомил Европу с этим «прыщом» [4]. В России первая работа о кожном лейшманиозе была представлена в виде диссертации Н. А. Арендта, врача русского посольства в Тегеране, в 1861 г. «О солке или алеппском прыще». Николай Андреевич Арендт (1833—1893 гг.) — известный земской врач, член «Симферопольского общества врачей» и его председатель с 1881 г. С 1859 г. Н. А. Арендт служил в Тегеране врачом при русской миссии, где были описаны его наблюдения. Вторым автором был М. В. Скоров, статья которого о «Елисаветпольском годовике» появилась в газете «Кавказ»

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 305001, Курск, ул. Карла Маркса, 3. Курский ГМУ

в 1864 г. и работа «Годовик или персидская болезнь в г. Елизаветполе» в 1868 г. [5]. В 1878 г. была издана работа Л. Л. Гейденрейха «Пендинская язва» с атласом, что на 12 лет раньше Leloir и Vidal.

Возбудитель болезни, получивший в дальнейшем название *Leishmania*, был открыт только в 1898 г. П. Ф. Боровским [3]. В 1898 г. П. Ф. Боровский точно определил систематическое положение Лейшмании, отнеся её к простейшим. В 1904 г. появилась статья Е. И. Марциновского и С. Л. Богрова «К вопросу об этиологии восточной язвы», в которой тщательно описан возбудитель, которого авторы относят к простейшим, близким к трипаносомам. К статье была приложена хорошая микрофотография, отчётливо изображающая виденных авторами паразитов. Это первая работа на русском языке и одна из первых в мире, где сделано строго научное, точное описание строения возбудителя болезни Боровского, описание ядра и кинетопласта, вакуоли, протоплазмы и указана внутриклеточная локализация паразита. В 1909 г. была опубликована известная диссертация Е. И. Марциновского «Этиология «восточной язвы» (bouttond'Orient) и краткие сведения об этой болезни».

Традиционно лабораторная диагностика кожного лейшманиоза основывалась на микроскопическом методе исследования, при котором врачи-лаборанты пользовались подробным описанием паразита Е. И. Марциновским. Современные врачи оснащены более широким спектром методов диагностики лейшманиоза, в том числе и метод ПЦР диагностики [6, 7].

В период становления медицины, врачи-знахари эмпирически стали использовать те средства, которые через много лет получили научное обоснование и вошли в медицинский обиход. Некоторые из этих средств применялись в начале 1940 годов или в чистом виде, такие как уксусная эссенция, воск, канифоль, свиное сало и др., или в изменённом виде — иней, ледяная сосулька (аналог криотерапии), калёное железо (в последствии аппарат Пакелена), химические чернила (современные анилиновые красители). Народные знахарские средства можно разделить на шесть групп: растения, разрушающие методы, «разные химические средства», физические методы лечения, жиры и жироподобные вещества, «разные» [8]. К группе «растения» относятся растения в естественном виде (сок маклюры, саккиз — сок дерева), семена клещевины, капустный лист, листья и сок айлантуса, а также продукты из растения (зола саксаула, зола ореховой скорлупы, зола бумаги, древесный порошкообразный уголь, дёготь). Разрушающие методы могут быть как кислотные (уксусная, соляная, азотная, соляная, насыщенная цинком, серная с древесным углём

кислоты), так и не кислотные (калёное железо, медный купорос, паташ, квасцы, полутахлористое железо). В третьей группе «разные химические средства» находятся киноварь с дёгтем, автол, химический карандаш, керосин, колесная мазь. Физические методы объединили все методы с использованием инея, снега, ледяной сосульки. Жироподобными веществами были: животные жиры (рыбий жир, свиное сало, козье сало, сливочное масло, бараний мозг) и растительные жиры (деревянное масло, камфорное масло, хлопковое масло, вазелиновое масло). Использовали также кислое молоко (сюзьма), и сок верблюжьего клеща, и пережженный навоз с кошмой, капустный лист, подорожник и др. [3].

К началу XX столетия распространённым методом лечения стало применение различных прижигающих и вяжущих средств: калёное железо и едкий калий (Гейденрейх), хром (Черепнин), ляпис и Liq. Bellosti (Рапчевский), молочная кислота (Маноцков, Шульгин), хлористый цинк (Мышкин, Сатинский) [9]. Е. И. Марциновский получил «хорошие результаты при впрыскивании в окружность язвы 50% раствора Chininibimuriatici (по 1,0 через день) и смазывании поверхности язвы тем же раствором» [10]. Е. И. Марциновский также применял хирургический метод лечения, удалил «под кокаином язвы и прыщи у четырёх больных, причём через несколько дней наступило полное заживление. Рецидивов не было» [10]. Профессор В. Л. Якимов в 1913 г. писал, что при кожном лейшманиозе нет определённого лечения [11]. Действительно, терапия кожного лейшманиоза к 30—40 годам двадцатого столетия была разнообразна. Было предложено много различных методов борьбы, эффективность которых во многих случаях была сомнительной. Е. И. Марциновский писал, что «если приступить к лечению язвы любым препаратом в период, когда она переходит в последнюю фазу заживления, то эффект получается блестящий; наоборот, при лечении начальных форм заболевания обычно почти все средства оказываются несостоятельными» [10]. П. В. Кожевников и соавт. считали, что «теоретическая разработка химиотерапии лейшманиоза находится в зачаточном состоянии; специальных работ, посвящённых этой проблеме мало» [10]. В то время, как врачи, работающие непосредственно на месте массовых заболеваний кожным лейшманиозом и наблюдающие каждого больного длительно, при их лечении учитывали естественный цикл заболевания и способность заболевания к самоизлечению [7, 12, 13].

В 1930—1940 годах начали применять комплексные методы лечения кожного лейшманиоза: физические методы (рентгенотерапия, радиотерапия, светолечение, электролечение, Д'Арсонваль, ионтофорез, криотерапия), хирур-

гическое лечение, местное применение медикаментозных средств, климато- и курортотечение, вакциноterapia, химиотерапевтические средства. При хирургическом методе лечения Abraham (1915 г.), Pulwermacher (1914—1916 гг.) и ряд других авторов (Walzberg, Ledermann, Hirschman, Hodara-Bey) путём эксцизии удаляли поражённый фокус, захватив попутно и часть окружающей здоровой ткани (демаркационную зону) во избежание рецидивов. Местные медикаментозные средства нашли применения при кожном лейшманиозе в форме мазей, присыпок, пластырей, мушек, компрессов. Наиболее часто использовали марганцовокислый калий, предложенный впервые Benoit. И. И. Рапчевский рекомендовал ежедневное смазывание язвы сулемовым коллодием. В. В. Войцеховский и Гизлер рекомендовали применение мушек. А. И. Поспелов получал хорошие результаты от примочек 2% борной кислотой. В. Л. Якимов применял присыпание язв порошком метиленовой зелени. О. В. Петерсен с хорошим успехом применял йодную настойку с последующим долечиванием ксероформенной пастой 5—10%, причём автор первоначально «раскрывал» язву 2—5% раствором салициловой кислоты в коллодиуме. Б. Н. Деревщиков применял хинную мазь в восходящей концентрации от 10 до 50%. Однако другие авторы в своих исследованиях эти результаты не подтверждали. Е. В. Корчиц (1924 г.), затем К. Я. Шульгин предлагали «специфическое средство» в виде 50% сурьмяной мази, которую применяли ещё в Древней Греции (проф. Фотинос). Каждый последующий автор, отвергая предшествующие средства как мало действующие, предлагал свой метод, как более специфическое. Однако в настоящее время эти методы представляют только исторический интерес.

В 1928 году в Париже на заседании общества тропической патологии Е. Lerat сообщил о применении им препарата Synectol для лечения 62 больных. Препарат состоит из экстрактов 5 растений: *Cupressus sempervirens*, *Plantagoeropoea*, *Mesen bryanthemum*, *Teucrium shamoedrys*, *Plantogolauceolata* на основе ланолина и масла какао. Перед употреблением Synectol расплавляется до 110—120°C и 5-кратно прилагается на область язвы, затем при температуре 60—80°C используется в виде аппликации.

Вторым новейшим препаратом стал «Тропин-52», который был разработан в 1929 г. в институте тропической медицины (СССР) во главе с Е. И. Марциновским и апробирован в Мервском оазисе. Состав препарата не раскрывался, методика применения была освещена. Перед употреблением ампулу, не вскрывая, погружают на 5 мин в нагретую до 38—40°C воду, после чего средство в виде примочки или компресса одноили двукратно накладывают на язву. Однако

впоследствии терапевтические свойства «Тропин-52» в отношении кожного лейшманиоза не подтвердились [14].

Сторонники климатотерапии при лечении кожного лейшманиоза считали, что «болезнь исчезает сама собой с переменой на более холодный климат» (А. И. Поспелов, 1907 г.). Курортотечение с бальнеотерапевтическими процедурами (с грязью) 40 пациентов, по данным С. П. Каталимова, также было неэффективным.

В 1928 г. в Советском Союзе велись исследования по разработке вакцины для терапии и профилактики кожного лейшманиоза на базе Института тропической медицины под руководством Е. И. Марциновского и Мервской тропической станции под руководством А. Н. Ходукина. Вакцина вводилась интервалами в 3—4 дня. Через шесть недель после окончания терапии исследователи убедились в малоуспешности вакцинотерапии.

В 1928 г. сообщается о лечении больных кожным лейшманиозом аутогемотерапией без эффекта [15].

В терапии кожного лейшманиоза применялись также химиотерапевтические средства. Для лечения КЛ был использован Сальварсан с положительным эффектом, с переменным успехом [16]. И. И. Гительзон и соавторы к 1933 г. пришли к выводу о неэффективности Сальварсана и Неосальварсана, когда после введения препарата обнаруживали морфологически неизмененные лейшмании в большом числе.

В начале XX века применялся препарат осарсол (мышьяковая кислота) *per os* и в форме присыпки. В качестве находки у больных с кожными проявлениями сифилиса при сопутствующем кожном лейшманиозе, в процессе лечения осаролом *per os* было отмечено выздоровление от сифилиса и неэффективность при лечении КЛ. Осарол и другие препараты мышьяка в форме присыпки также были не эффективны [9, 15]. Лечение КЛ препаратами ртути, оказавшимися эффективными в отношении сопутствующего сифилиса, также не действовали на лейшмании. Без эффекта было применение йодистого калия, Ichthyola, препаратов золота, хинина, кроме того были побочные явления, вынуждавшие врачей отказаться от продолжения терапии.

Наиболее эффективным, по мнению ряда исследователей, является препарат Рвотного камня (препараты сурьмы), который применяется по настоящее время. Впервые сурьмяные препараты были применены при лечении американского лейшманиоза Vianna и Machado (1913 г.), затем Cristina и Coronia (1915 г.) — при детском лейшманиозе [15]. Из отечественных авторов при генерализованном и кожном лейшманиозе сурьму применяли М. И. Слоним, А. Н. Ходукин,

Р. С. Гершеневич, А. В. Артамонов, А. С. Прядко, М. Б. Султанов и Д. С. Худадов, Н. Уйманов, А. И. Блинников и считали, что «терапия кожного лейшманиоза вступила на многообещающий путь химиотерапии» [17].

При изучении действия акрихина Н. В. Добротворская с соавторами отметили разрешение язвы при введении препарата в недавно сформированную воспалительную папулу, однако рубец оставался [9]. Доктор А. А. Макарына считала, что не следует лечить abortивную (сухую) форму кожного лейшманиоза, при которой после самоизлечения остаётся более нежный в косметическом отношении рубец, чем после химиотерапии. К 1930 г. были испытаны все известные методы лечения КЛ и сформировано убеждение, что каждый отдельный случай заболевания требует отдельной для него терапии [14]. «Тот разноречивый в лечении кожного лейшманиоза, о котором проф. Якимов писал ещё в 1913 г., к сожалению, существует ещё до сих пор. Пока ещё нет специфического средства и нет единого мнения о принципах лечения», — писала Н. В. Добротворская в 1940 г., что актуально по настоящее время [9].

К середине 40 годов прошлого столетия на базе Туркменского кожно-венерологического института сотрудниками института медицин-

ской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского были созданы модельные линии экспериментального кожного лейшманиоза на белых мышах, которое положило начало для планомерного научного изучения действия различных химиопрепаратов на кожный лейшманиоз [8, 18]. Был разработан и внедрён в практическое здравоохранение антибиотик мономицин и препарат пятивалентной сурьмы солюсурмин [15, 19].

В мировой практике здравоохранения, по рекомендациям ВОЗ от 2010 г., для специфического лечения кожного лейшманиоза применяют препараты пятивалентной сурьмы [19, 20], противоопухолевое средство для местного применения: Милтефозин (Импавидо, Паладин — Канада) [21], антибактериальные препараты: Амфотерицин В, АмБисом; Паромомицин (Индия), Мономицин (Узбекистан), препараты неспецифического, вспомогательного действия: антисептики, действие которых направлено на борьбу с присоединившейся вторичной инфекцией [13, 19]. На территории Российской Федерации эти препараты не зарегистрированы и обеспечение препаратами лечения кожного лейшманиоза остается актуальной задачей практического здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Официальный сайт ФМС России fms.gov.ru / Oficial'nyj sajt FMS Rossii fms.gov.ru
2. Официальный сайт Роспотребнадзор rospotrebnadzor.ru / Oficial'nyj sajt Rospotrebnadzor rospotrebnadzor.ru
3. Ханафиева И.В. Применение иммуностимуляторов в терапии зоонозного кожного лейшманиоза. Автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Ашгабат: 1996; 29. / Khanafieva I.V. Primenenie immunostimulyatorov v terapii zoonoznogo kozhnogo lejshmanioza. Avtoreferat na soiskanie uchenoj stepeni kandidata medicinskih nauk, Ashgabat: 1996; 29. [in Russian]
4. Гейденрейх. Пендинская язва. СПб.: 1888. / Gejdenrejkh. Pendinskaja jazva. SPB.: 1888. [in Russian]
5. WHO. Fight with leishmaniasis. The Report at a meeting of Committee of WHO experts on fight with leishmaniasis, Geneva. 2010; 223—225.
6. Жиренкина Е.Н., Понировский Е.Н., Стрелкова М.В., Морозов Е.Н. и др. Особенности эпидемиологии висцерального лейшманиоза в Папском районе Наманганской области Узбекистана, выявление при обследовании детей методом ПЦР. Мед паразитол паразитар бол 2011; 3: 37—42. / Zhirenkina E.N., Ponirovskij E.N., Strelkova M.V., Morozov E.N. i dr. Osobennosti jepidemiologii visceral'nogo lejshmanioza v Papskom rajone Namanganskoj oblasti Uzbekistana, vyjavlenie pri obsledovanii detej metodom PCR. Med parazitolog parazitarnykh boleznej. Infekc bol: novosti, mnenija, obuchenie. 2014; 1: 36—38. / Morozov E.N., Kuznecova K.Ju. Molekuljarnaja diagnostika parazitarnykh boleznej. Infekc bol: novosti, mnenija, obuchenie. 2014; 1: 36—38. [in Russian]
7. Морозов Е.Н., Кузнецова К.Ю. Молекулярная диагностика паразитарных болезней. Инфекц бол: новости, мнения, обучение. 2014; 1: 36—38. / Morozov E.N., Kuznecova K.Ju. Molekuljarnaja diagnostika parazitarnykh boleznej. Infekc bol: novosti, mnenija, obuchenie. 2014; 1: 36—38. [in Russian]
8. Слоним М.И. О лечении кожного лейшманиоза. Туркменский мед журн 1922; 2: 23—25. / Slonim M.I. O lechenii kozhnogo lejshmanioza. Turkmenskij med zhurn 1922; 2: 23—25. [in Russian]
9. Добротворская Н.В. Лечение кожного лейшманиоза. Сборник работ первого межреспубликанского совещания по кожному лейшманиозу и москитной проблеме. Ашхабад. 1940; 207—227. / Dobrotvorskaja N.V. Lechenie kozhnogo lejshmanioza. Sbornik rabot pervogo mezhrespublikanskogo soveshhanija po kozhnomu lejshmaniozu i moskitnoj probleme. Ashkhabad. 1940; 207—227. [in Russian]
10. Марциновский Е.И. Этиология «восточной язвы» (bouttond'Orient) и краткие сведения об этой болезни. Диссертация на степень доктора медицины. М.: 1909. / Marcinovskij E.I. Jetiologija «vostochnoj jazvy» (bouttond'Orient) i kratkie svedenija ob jetoj bolezni. Dissertacija na stepen' doktora mediciny. M.: 1909. [in Russian]
11. Гутельзон И.И. Кожный лейшманиоз (пендинская язва). Туркменгосиздат. Ашхабад: 1933; 216—286. / Gutel'zon I.I. Kozhnyj lejshmanioz (pendinskaja jazva). Turkmengosizdat. Ashkhabad: 1933; 216—286. [in Russian]
12. Морозова Л.Ф., Тумальская Н.И. Завозной лейшманиоз: дифференциальная диагностика и лечение. Инфекц бол: новости, мнения, обучение. 2014; 1: 47—51. / Morozova L.F., Tumul'skaja N.I. Zavoznoj lejshmanioz: differencial'naja diagnostika i lechenie. Infekc bol: novosti, mnenija, obuchenie. 2014; 1: 47—51. [in Russian]
13. Трозянц Г.Н. и Шупак Б.М. Народно-знахарские средства в лечении кожного лейшманиоза. Советское здравоохранение Туркмении 1941; 3: 23—26. / Trozjanc G.N. i Shhupak B.M. Narodno-znakharskie sredstva v lechenii kozhnogo lejshmanioza. Sovetskoe zdravookhranenie Turkmenii 1941; 3: 23—26. [in Russian]
14. Макарына А.А. Клиника и лечение кожного лейшманиоза. Ташкент: 1934; 34—45. / Makar'in A.A. Klinika i lechenie kozhnogo lejshmanioza. Tashkent: 1934; 34—45. [in Russian]
15. Келлина О.И. Испытание химиотерапевтической активности некоторых препаратов при экспериментальном кожном лейшманиозе белых мышей. Проблемы медицинской и профилактической инфекций. М.: 1964; 37—43. / Kellina O.I. Ispytanie khimioterapevteskoj aktivnosti nekotorykh preparatov pri jeksperimental'nom kozhnom lejshmanioze belykh myshej. Problemy medicinskoj i profilaktiki infekcij. M.: 1964; 37—43. [in Russian]
16. Петерсен О.В. О специальных больницах для сифилитиков и кожных больных. Русский врач. 1913; 43: 57—58. / Petersen O.V. O special'nykh bol'nitsakh dlja sifilitikov i kozhnykh bol'nykh. Russkij vrach. 1913; 43: 57—58.
17. Кузнецова Ю.К., Сирмайс Н.С. Микст-инфекции кожи с тонким эпидермисом и деликатные топические комбинированные средства. Международ научно-исслед журн 2013; 9 (16): 24—30. / Kuznecova Ju.K., Sirmajs N.S. Mikst-infekcii kozhi s tonkim jepidermisom i delikatnye topicheskie kombinirovannye sredstva. Mezhdunarod nauchno-issled zhurn 2013; 9 (16): 24—30. [in Russian]
18. Сергиев П.Г. Многоотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. Том IX. Издательство «Медицина», М.: 1968; 33—40. / Sergeev P.G. Mnogotomnoe rukovodstvo po mikrobiologii, klinike i jepidemiologii infekcionnykh boleznej. Tom IX. Izdatel'stvo «Medicina», M.: 1968; 33—40.
19. Кожневиков П.В., Добротворская Н.В., Латышев Н.И. Учение о кожном лейшманиозе. Медгиз, 1947; 183—231. / Kozhevnikov P.V., Dobrotvorskaja N.V., Latyshev N.I. Uchenie o kozhnom lejshmanioze. Medgiz, 1947; 183—231. [in Russian]

Dobrotvorskaja N.V., Latyshev N.I. Uchenie o kozhnom leishmanioze. Medgiz, 1947; 183—231. [in Russian]

20. *Бронштейн А.М., Малышев Н.А., Давыдова И.В., Сергеев В.П., Кочергин Н.Г.* Наблюдения зоонозного кожного лейшманиоза у московских туристов, посетивших Тунис, и их успешной терапии кетоназолом. Росс журн кожн венер бол 2005; 6: 30—33. / *Bronshitejn A.M., Malyshev N.A., Davydova I.V., Sergiev V.P., Kochergin N.G.* Nabljudeniya

zoonoznogo kozhnogo leishmanioza u moskovskikh turistov, posetivshikh Tunis, i ikh uspeshnoj terapii ketokonazolom. Ross zhurn kozhn vener bol 2005; 6: 30—33. [in Russian]

21. *Ходукин Н.И.* К истории изучения лейшманиозов в России. Очерки по истории паразитологии. М.: 1953; 5—39. / *Khodukin N.I.* K istorii izuchenija leishmaniozov v Rossii. Ocherki po istorii parazitologii. M.: 1953; 5—39. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Юлия Константиновна — аспирант, м.н.с., НИИ медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского ГБОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

Сергеев В.П. — д.м.н., академик РАМН, профессор, заведующий кафедрой «Тропические болезни и медицинская паразитология» МПФ ГБОУ высшего профессионально-

го образования Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, НИИ МПитМ им. Е. И. Марциновского, Москва.

Кузнецова Камал Янис кызы — к.м.н., доцент кафедры «Тропические болезни и медицинская паразитология» МПФ ГБОУ высшего профессионального образования Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, НИИ МПитМ им. Е. И. Марциновского, Москва

**КОМБИНИРОВАННЫЙ СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД
ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ МНОГОСТАДИЙНОГО
МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МОРЯ
АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА, АКТИВНОГО
В ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕННОЙ *ESCHERICHIA COLI*
И ОБЛАДАЮЩЕГО ЗАЩИТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ
ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ
И ЭНДОТОКСИЕМИИ.**

**COMBINED SYSTEMS APPROACHES REVEAL
A MULTISTAGE MODE OF ACTION OF A MARINE
ANTIMICROBIAL PEPTIDE AGAINST PATHOGENIC
ESCHERICHIA COLI AND ITS PROTECTIVE EFFECT
AGAINST BACTERIAL PERITONITIS
AND ENDOTOXEMIA / X. WANG, DA TENG, R. MAO,
N. YANG, Y. HAO, J. WANG* // ANTIMICROB AGENTS
CHEMOTHER JANUARY 2017; L: 61: 1: E01056—16.**

Производное ареницина-3, N4, полученное из морских ресурсов, проявило высокую антибактериальную активность в отношении грамотрицательных бактерий, но механизм антибактериального действия остаётся невыясненным. Механизм действия N4 в отношении патогенной *Escherichia coli* был впервые изучен с использованием комбинации цитологической и транскриптомной техники. Пептид N4 в течение 1 мин проникал через наружную мембрану, за 30 мин разрушал плазматическую мембрану и за 5 мин локализовался в цитоплазме. Замедление гелеобразования и анализ спектра циркулярного дихроизма показали, что N4 специфически связывается с ДНК и переводит конформацию ДНК из состояния В в состояние С. За 15 мин N4 подавлял на 21,1% синтез ДНК и на 20,6% — синтез РНК. N4 через 0,5 ч индуцировал в клетках *E. coli* некоторые признаки апоптозо-подобной гибели, а именно, задержку таких фаз клеточного цикла, как репликация (R) и деление (D), образование форм реактивного кислорода, деполяризация заряда плазматической мембраны, конденсация хроматина. Трансмиссивной электронной микроскопией были показаны изменения в морфологии клеток, исчезновение плазматической мембраны, вытекание содержимого клетки до сохранения только её контуров; под действием N4 погибало до 100% бактерий. В отклике на N4 было задействовано от 428 до 663 генов с различной экспрессией, ассоциированных, главным образом, с биогенезом мембраны (53,9—56,7%) и связыванием ДНК (13,3—14,9%). Защитное действие N4 в отношении мышей, обработанных летальной дозой липополисахарида (ЛПС), выражалось в снижении в сыворотке уровня интерлейкина-6 (IL-6), IL-1 β , и α -фактора некроза опухолей (TNF- α), а также защите лёгких от повреждения ЛПС. Полученные данные способствовали углублённому пониманию механизма действия антимикробных

пептидов (АМП), созданию руководства по получению и применению новых многоцелевых АМП как терапевтических средств, получаемых из неограниченных морских ресурсов.

* Key Laboratory of Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture, Beijing, China.

* Gene Engineering Laboratory, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China.

**НОВЫЙ МАКРОЛИДНЫЙ АНТИБИОТИК
СОЛИТРОМИЦИН НЕ ПРОЛОНГИРУЕТ
КАРДИАЛЬНУЮ РЕПОЛЯРИЗАЦИЮ:
РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ТРЁХСТОРОННЕЕ
ПЕРЕКРЁСТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НА ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦАХ.**

**SOLITHROMYCIN, A NOVEL MACROLIDE,
DOES NOT PROLONG CARDIAC REPOLARIZATION:
A RANDOMIZED, THREE-WAY CROSSOVER STUDY
IN HEALTHY SUBJECTS / B. DARPO*, P. T. SAGER,
P. FERNANDES, B. D. JAMIESON, K. KEEDY,
M. ZHOU, D. OLDACH // J ANTIMICROB CHEMOTHER
2017; 72 (2): 515—521.**

В связи с тем, что макролидные антибиотики могут вызывать пролонгацию интервала QT, оценивали влияние нового макролидного антибиотика солитромицина на электрокардиограмму (ЭКГ) здоровых добровольцев обоего пола в формате трёхстороннего перекрёстного исследования. Сорок восемь (48) рандомизированно разделённых на группы добровольцев получали в/в 800 мг солитромицина, 400 мг перорально моксифлоксацина или плацебо. Были сняты 12 ЭКГ, начиная с исходной ЭКГ (до приёма) и далее после приёма лекарства на протяжении 24 ч в виде непрерывной серии измерений. После 40 мин инфузии 800 мг солитромицина среднее геометрическое значение пиковой концентрации в плазме (C_{max}) достигало 5,9 (SD: 1,30) мкг/мл. Инфузия солитромицина вызывала увеличение сердечных сокращений в мин с пиком 15 bpm сразу после окончания инфузии. Отклонение от исходного значения QTcF (Δ QTcF) было сходным после введения солитромицина и плацебо, и в результате коррекция на плацебо Δ QTcF ($\Delta\Delta$ QTcF) отклонение для солитромицина было незначительным на всех временных отрезках с пиковым значением 2,8 ms (верхняя граница 90% ДИ: 4,9 ms) на 4 ч. На линейной модели экспозиция-отклик с солитромицином наблюдалась статистически значимая слабая негативная реакция $-0,86$ ms на нг/мл (90% ДИ: $-1,19$ до $-0,53$; $p=0,0001$). Способность исследования в данном формате выявлять небольшие измене-

ния QT была также подтверждена на примере отклика на моксифлоксацин. Солитромицин не оказывал клинически значимого влияния на PR или QRS интервал. Итак, в отличие от других макролидных антибиотиков, солитромицин не вызывал пролонгации QT.

* Karolinska Institutet, Division of Cardiovascular Medicine, Department of Clinical Sciences, Danderyd's Hospital, Stockholm, Sweden.

* iCardiac Technologies, Inc., 150 Allens Creek Road, Rochester, NY 14618, USA.

МОНОТЕРАПИЯ ПОЛИМИКСИНОМ ИЛИ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ ПРОТИВ КАРБАПЕНЕМОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР И МЕТА-АНАЛИЗ.

POLYMYXIN MONOTHERAPY OR IN COMBINATION AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT BACTERIA: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS / O. ZUSMAN*, S. ALTUNIN, F. KOPPEL, Y. D. BENATTAR, H. GEDIK // J ANTIMICROB CHEMOTHER 2016; 72 (1): 29—39.

Задачей исследования было суммировать имеющиеся данные о монотерапии полимиксином (РМВ) и комбинированной на его основе терапии против устойчивых к карбапенемам грамотрицательных бактерий. В обзор были включены наблюдательные исследования и рандомизированные контролируемые испытания (RCT), сравнивающие монотерапию и РМВ-комбинированную терапию взрослых больных с инфекциями, обусловленными карбапенемоустойчивыми и карбапенемазобразующими грамотрицательными бактериями. Главным показателем была 30-дневная смертность. В рандом-эффекты мета-анализа были включены значения нескорректированных, uOR, и скорректированных, OR, отношений рисков с 95% ДИ. Всего были использованы результаты 22 исследований, содержащих 28 сравнительных данных. При монотерапии РМВ (значение uOR = 1,58; 95%ДИ = 1,03—2,42), показатель смертности был сравним с таковым при комбинированной терапии РМВ+карбапенем (7 наблюдательных исследований, 537 больных), без гетерогенности. В подгруппах исследований с серьезным и критическим риском ошибки в оценке значения uOR составили, соответственно, 0,94 (95%ДИ = 0,42—2,09) и 1,94 (95%ДИ = 1,17—3,23). Смертность при монотерапии РМВ была существенно выше по сравнению с комбинированной терапией РМВ с тигециклином, аминогликозидами или фосфомицином: uOR 1,57 (95%ДИ = 1,06—2,32) в целом (10 наблюдательных исследований и 1 RCT, 585 больных) и

uOR 2,09 (95%ДИ = 1,21—3,6) при *Klebsiella pneumoniae* бактериемии (7 наблюдательных исследований, 285 больных, без гетерогенности); при очень низкой степени доказательности. В 2-х RCT и 1 наблюдательном испытании, оценивающих комбинированную терапию РМВ+рифампицин при *Acinetobacter baumannii* инфекциях, не было показано различий в смертности по сравнению с монотерапией РМВ при умеренной степени доказательности. Таким образом, наблюдаемая в наблюдательных исследованиях значительная ассоциация между РМВ монотерапией и смертностью не может служить доказательством эффективности комбинированной терапии из-за низкой степени доказательности. Только данные 3 RCT показали отсутствие влияния комбинаций рифампицин+РМВ и фосфомицин+РМВ на смертность при *Acinetobacter baumannii* инфекциях.

* Department of Medicine E, Rabin Medical Center, Petah-Tiqva, Israel.

КОМБИНАЦИЯ ПОЛИМИКСИНА В С МЕРОПЕНЕМОМ ПРОТИВ КАРБАПЕНЕМАЗООБРАЗУЮЩЕЙ KLEBSIELLA PNEUMONIAE: ФАРМАКОДИНАМИКА И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ.

POLYMYXIN B IN COMBINATION WITH MEROPENEM AGAINST CARBAPENEMASE-PRODUCING KLEBSIELLA PNEUMONIAE: PHARMACODYNAMICS AND MORPHOLOGICAL CHANGES / R. SHARMA, S. PATEL, C. ABBODD, J. DIEP, N. S. LY, J.M. POGUE, K. S. KAYE, J. LI, G. G. RAO* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS FEBRUARY 2017; 49; 2: 224—232.

Комбинированная терапия представляется полезным приемом преодоления устойчивости при отсутствии новых антибиотиков. Была изучена фармакодинамика (ФД), в т.ч. влияние полимиксина В (РМВ) и меропенема по отдельности и в комбинации на морфологию клеток карбапенемазобразующих клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae* (n=10), выделенных от больных, леченных по поводу медиастинита. Были идентифицированы карбапенемазы (КРС) и определены значения МПК микроразведениями в бульоне. С РМВ (0,5—16 мг/л) и меропенемом (20—120 мг/л) по отдельности и в комбинации были выполнены 24-часовые «time-kill» исследования с исходным инокуломом 10⁶ КОЕ/мл. Для анализа изменений бактериальной морфологии после обработки антибиотиками использовали сканирующую электронную микроскопию (СЭМ), а для количественной оценки ФД — метод log изменения. Все штаммы содержали ген *bla*_{KPC-2} и были устойчивы к меропенему (МПК ≥ 8 мг/л). Клинически реле-

вантные концентрации РМВ (0,5; 1,0 и 2,0 мг/л) в комбинации с меропенемом оказывали синергидный эффект на все штаммы, за исключением ВРКР28 (полимиксино-и меропенемоустойчивый штамм с МПК для обоих антибиотиков >128 мг/л). Все концентрации РМВ и меропенема в комбинации были бактерицидны в отношении чувствительных к РМВ штаммов, имеющих значения МПК меропенема ≤16 мг/л. СЭМ выявила обширные морфологические изменения после обработки комбинацией РМВ и меропенема в сравнении с обработкой отдельными антибиотиками. Кроме того, морфологические изменения снижались при повышении уровня устойчивости штамма, что выражалось в возросшем значении МПК меропенема. Антимикробный эффект является не только суммой действий каждого антибиотика, но результатом их различного действия на защитный механизм бактерии.

* Clinical Pharmacology & DMPK, MedImmune LLC, Mountain View, CA, USA.

ВЫСОКОИНТЕНСИВНЫЕ КОМБИНАЦИИ МЕРОПЕНЕМА С ПОЛИМИКСИНОМ В: НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ПРЕОДОЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ *ACINETOBACTER BAUMANNII* К КАРБАПЕНЕМАМ.

**HIGH-INTENSITY MEROPENEM COMBINATIONS
WITH POLYMYXIN B: NEW STRATEGIES TO OVERCOME
CARBAPENEM RESISTANCE IN *ACINETOBACTER
BAUMANNII* / J. R. LENHARD, J. B. BULITTA,
T. D. CONNELL, N. KING-LYONS, C. B. LANDERSDORFER,
S.-E. CHEAN, V. THAMLIKITKUL, B. S. SHIN, G. RAO,
P. N. HOLDEN, T. J. WALSH, A. FORREST, R. L. NATION,
J. LI, B.T. TSUJI*//J ANTIMICROB CHEMOTHER 2016;
72 (1): 153—165.**

Фармакодинамика комбинаций полимиксин В (РМВ)/карбапенем в отношении устойчивых к карбапенемам штаммов *Acinetobacter baumannii* (CRAB) в значительной степени не изучена. Целью исследования было определить, усиливает ли интенсификация меропенем-содержащих режимов терапии в комбинации с РМВ бактерицидность и подавление устойчивости CRAB штаммов к карбапенемам. Исследовали методом «time-kill» бактерицидное действие комбинаций РМВ/меропенема в отношении 3 чувствительных к РМВ (МПК РМВ 0,5 мг/л) CRAB штаммов ATCC 19606, N16870 и 03-149-1 (МПК меропенема = 4, 16 и 64 мг/л, соответственно) при 10⁸ КОЕ/мл. Для имитации клинических режимов введения РМВ и меропенема (инфузия 2, 4, 6 и 8 г каждые 8 ч) на протяжении более 14 дней на примере штамма N16870 с 10⁸ КОЕ/мл использовали модель инфекции с диализными

мембранами. Были разработаны новые математические модели на основе S-ADAPT. Согласно математическому моделированию экспериментов «time-kill» наличие в комбинации РМВ резко снижало концентрацию меропенема для достижения 50% максимальной активности в отношении меропенемоустойчивой популяции: с 438 до 82,1 (ATCC 19606), с 158 до 93,6 (N16870) и с 433 до 76,0 мг/л (03-149-1). Максимальный бактерицидный эффект комбинации был сходным для всех 3 штаммов, несмотря на различные значения МПК (E_{max} = 2,13; 2,08 и 2,15; МПК меропенема 4, 16 и 64 мг/л, соответственно). Увеличение дозы меропенема на модели с диализными мембранами с 2 г каждые 8 ч до 8 г/8 ч приводило к гибели бактерий при вторичном росте на >2,5 log₁₀ КОЕ/мл к 72 ч (2 г/8 ч) или к полной эрадикации к 336 ч (8 г/8 ч). Увеличение дозы меропенема в комбинации с РМВ может представлять уникальную стратегию эрадикации CRAB независимо от значения МПК меропенема.

* Laboratory for Antimicrobial Dynamics, NYS Center of Excellence in Bioinformatics & Life Sciences, Buffalo, NY, USA.

* School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, Buffalo, NY, USA.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА MCR-1-СОДЕРЖАЩИХ ПЛАЗМИД, ДАЮЩАЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ДИССЕМИНАЦИЮ ДЕТЕРМИНАНТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К КОЛИСТИНУ.

**GENETIC CHARACTERIZATION OF MCR-1-BEARING
PLASMIDS TO DEPICT MOLECULAR MECHANISMS
UNDERLYING DISSEMINATION OF THE COLISTIN
RESISTANCE DETERMINANT / R. LI, M. XIE, J. ZHANG,
Z. YANG, L. LIU, X. LIU, Z. ZHENG, E. W.-C. CHAN,
S. CHEN*//J ANTIMICROB CHEMOTHER 2017;
72 (2): 393—401.**

Задачей исследования был сравнительный анализ *mcr-1*-содержащих плазмид, выделенных из штаммов *Escherichia coli* животного происхождения, и исследование возможных механизмов диссеминации *mcr-1*. Было проверено на наличие гена *mcr-1* 97 БЛРС-продуцирующих штаммов *E.coli*, выделенных на свинофермах Китая, 50 из них были охарактеризованы на молекулярном уровне, а *mcr-1*-несущие плазмиды были подвергнуты биоинформационному анализу. Были установлены 3 главных типа *mcr-1*-несущих плазмид: IncX4 (33 kb), IncI2 (60 kb) и IncHI2 (216-280 kb), из которых плазмиды IncX4 и IncI2 содержали только ген *mcr-1*, тогда как в плаزمиде IncHI2

типа поблизости от гена *mcr-1* были обнаружены множественные детерминанты устойчивости, включая *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, *bla*_{TEM}, *fosA*, *qnrS*, *floR* и *oqxAB* в различных комбинациях. Профиль *mcr-1*-несущих плазмид сильно варьировал, общим явлением было сосуществование двух *mcr-1*-содержащих плазмид. Число *mcr-1*-содержащих плазмид не влияло на значение МПК колистина. Сравнительный анализ плазмид показал, что наиболее активной в распространении кассеты с *mcr-1* геном, имеющей варьирующую структуру (*mcr-1-orf*, *IS**Apl1-mcr-1-orf* и *Tn6330*), была плазмида IncHI2 типа. Было установлено, что ключевым элементом, опосредующим перемещение *mcr-1* в различные плазмиды через образование промежуточного продукта кольцевого строения, является новый транспозон *Tn6330*, имеющий структуру *IS**Apl1-mcr-1-orf-ISApl1*. Итак, ген *mcr-1* может диссеминировать с помощью множественных мобильных элементов, в т.ч. кольцевой промежуточной формы *Tn6330*, и плазмид, содержащих такие элементы. Функциональный механизм *Tn6330*, типично сложного транспозона, содержащего *mcr-1*, ещё предстоит исследовать.

* Shenzhen Key Lab for Food Biological Safety Control, Food Safety and Technology Research Center, Hong Kong PolyU Shen Zhen Research Institute, Shenzhen, P. R. China.

* The State Key Lab of Chirosciences, Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Kowloon, Hong Kong SAR.

КЛАССИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ БЕТА-ЛАКТАМАЗ УСИЛИВАЮТ АКТИВНОСТЬ ДАПТОМИЦИНА В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И КОЛИСТИНА В ОТНОШЕНИИ *ACINETOBACTER BAUMANNII*.

CLASSICAL β -LACTAMASE INHIBITORS POTENTIATE THE ACTIVITY OF DAPTOMYCIN AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND COLISTIN AGAINST *ACINETOBACTER BAUMANNII* / G. SAKOULAS*, W. ROSE, A. BERTI, J. OLSON, J. MUNGUIA, P. NONEJUIE, E. SAKOULAS, M. J. RYBAK, J. POGLIANO, V. NIZET // ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER FEBRUARY 2017; 61: 2: E01745—16.

Была предпринята попытка выяснить, усиливают ли ингибиторы бета-лактамаз (ИБЛ) активность даптомицина (ДАП) в отношении метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA), пептидного антибиотика колистина (КОЛ) в отношении нозокомиального патогена *Acinetobacter baumannii*, и антимикробного пептида человека кателицидина LL37 в отношении выше назван-

ных патогенов. Были определены кривые гибели бактерий под действием ДАП и LL37 в отношении MRSA, *S.aureus* с промежуточной чувствительностью к ванкомицину (VISA) и гетерогенной чувствительностью (hVISA) в присутствии или без ИБЛ. Было также определено бактерицидное действие КОЛ и LL37 на *A.baumannii*. Связывание BODIPY (борон-дипиррометен)-меченного ДАП с MRSA, культивируемого в присутствии тазобактама (ТАЗ), определяли микроскопированием. Комбинация КОЛ с ТАЗ была изучена на модели *A.baumannii* пневмонии у мышей. ТАЗ не обладал *in vitro* активностью в отношении MRSA и *A.baumannii*. Добавление ТАЗ к ДАП приводило к большему снижению восстановленного через 24 ч числа КОЕ MRSA на 2 — 5 log10 по сравнению с действием одного ДАП. Комбинация ТАЗ+КОЛ демонстрировала синергизм в отношении 4 из 5 проверенных штаммов *A.baumannii*, согласно данным кривых гибели бактерий. Рост в присутствии 20 мг/л ТАЗ вызывал 2—2,5-кратное увеличение интенсивности связывания BODIPY-ДАП с MRSA и hVISA штаммами. ТАЗ значительно увеличивал бактерицидность LL37 *in vitro* в отношении MRSA и *A.baumannii*. На модели *A.baumannii* пневмонии у мышей ТАЗ также повышал активность КОЛ. Таким образом, классические ИБЛ демонстрировали синергизм с пептидными антибиотиками. Поскольку ИБЛ обладают слабой антимикробной активностью, увеличение селективного подавления антибиотикорезистентности было неожиданным. Применение комбинаций ИБЛ с пептидными антибиотиками требует дальнейшего изучения.

* University of California-San Diego School of Medicine, La Jolla, California, USA.

* Sharp Healthcare System, San Diego, California, USA.

ИНГИБИТОРЫ БЕТА-ЛАКТАМАЗ УСИЛИВАЮТ СИНЕРГИЗМ МЕЖДУ БЕТАЛАКТАМНЫМИ АНТИБИОТИКАМИ И ДАПТОМИЦИНОМ В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

β -LACTAMASE INHIBITORS ENHANCE THE SYNERGY BETWEEN β -LACTAM ANTIBIOTICS AND DAPTOMYCIN AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / K. E. R. HENSON, J. YIM, J. R. SMITH, G. SAKOULAS, M. J. RYBAK* // ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER JANUARY 2017; 61: 1: E01564—16.

Число доказательств в пользу применения комбинированной терапии при тяжёлых инфекциях, вызванных метициллиноустойчивым *Staphylococcus*

aureus (MRSA), постоянно растёт. В экспериментах «time-kill» был исследован синергидный эффект комбинации даптомицина (ДАП) с пиперациллином/тазобактамом или ампициллином/сулбактамом в отношении MRSA. Комбинация ДАП с бета-лактамом+ ингибитор бета-лактамаз (ИБЛ) оказывала синергидное действие на 6 из 8 штаммов. В отношении 5 из 8 штаммов синергидный эффект наблюдали только в присутствии ИБЛ, что свидетельствует о роли ИБЛ в синергидном действии комбинации пептид+бета-лактамов.

* Division of Infectious Diseases, Wayne State University and Detroit Medical Center, Detroit, Michigan, USA.

* Anti-infective Research Laboratory, Department of Pharmacy Practice, Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences, Wayne State University, Detroit, Michigan, USA.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* К БЕТАЛАКТАМАМ, ОПОСРЕДОВАННОЕ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ДАПТОМИЦИНУ (ЭФФЕКТ «КАЧЕЛЕЙ»).

MOLECULAR BASES DETERMINING DAPTOMYCIN RESISTANCE-MEDIATED RESENSITIZATION TO β -LACTAMS (SEESAW EFFECT) IN METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / A. RENZONI, W. L. KELLEY, R. R. ROSATO, M. P. MARTINEZ, M. ROCH, M. FATOURAEI, D. P. HAEUSSER, W. MARGOLIN, S. FENN, R. D. TURNER, S. J. FOSTER, A.E. ROSATO* // ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER JANUARY 2017; 61: 1: E01634—16.

Устойчивость к антимикробным препаратам обозначена как одна из главных угроз в глобальном здравоохранении, и эта проблема нарастает. Инфекции, обусловленные метициллиноустойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus* (MRSA), относятся к числу наиболее трудно поддающихся лечению в условиях клиники из-за устойчивости MRSA почти ко всем применяемым антибиотикам. Циклический анионный липопептид даптомицин (ДАП) является основой анти-MRSA терапии. Пониженная чувствительность к ДАП (ДАП-устойчивость, DAP^r) часто сопровождается парадоксальным снижением устойчивости к бета-лактамам, явлением, известным как «эффект качелей». Несмотря на различия фенотипов устойчивости, комбинация ДАП с бета-лактамами характеризуется как клинически эффективная при профилактике и лечении больных с инфекциями, вызванными DAP^r MRSA штаммами. Механизмы взаимодействия между ДАП и бета-лак-

тами в основном не известны. Здесь приведены результаты изучения роли *mprF* и индуцированных ДАП мутаций в сенсibilизации к бета-лактамам и участия их в эффективном бактерицидном действии комбинации ДАП+оксациллин(ОКСА). Результатом действия комбинации ДАП+ОКСА было нарушение клеточной стенки, включая изменения в инсерции пептидогликана, делокализации пенициллин-связывающего белка 2 (ПСБ 2) и снижение количества ПСБ 2а в мембране, наряду с повышением транскрипции *mecA* через регуляторные *mec* элементы. Было найдено, что ключевым элементом ДАП-устойчивости является сенсор-регулятор VraSR (двухкомпонентная система, регулирующая транскрипционную индукцию ПСБ2 под влиянием ванкомицина), иницирующий *mprF*-опосредованные модификации мутированной клеточной мембраны, в результате чего нарушаются локализация PrsA и функции шаперона, которые существенны для созревания ПСБ 2а, ключевой детерминанты устойчивости к бета-лактамам. Полученные данные впервые показали, что в синергидные эффекты между ДАП и бета-лактамами вовлечена PrsA — посттранскрипционная регуляция ПСБ 2а клеточной мембраны.

* Department of Pathology and Genomic Medicine, Center for Molecular and Translational Human Infectious Diseases Research, Houston Methodist Research Institute, Houston, Texas, USA.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА И АМРС ТИПА, И КАРБАПЕНЕМАЗ СРЕДИ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE, ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ И МОЧЕВОГО ТРАКТА В АЗИАТСКО-ТИХООКЕАНСКОМ РЕГИОНЕ В ПЕРИОД 2008—2014 ГГ., ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МОНИТОРИНГА ТЕНДЕНЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ (SMART).

DISTRIBUTION OF ESBLs, AMPC β -LACTAMASES AND CARBAPENEMASES AMONG ENTEROBACTERIACEAE ISOLATES CAUSING INTRA-ABDOMINAL AND URINARY TRACT INFECTIONS IN THE ASIA-PACIFIC REGION DURING 2008—2014: RESULTS FROM THE STUDY FOR MONITORING ANTIMICROBIAL RESISTANCE TRENDS (SMART) / S.-S. JEAN, PO-REN HSUEN*, ON BEHALF OF THE SMART ASIA-PACIFIC GROUP // J ANTIMICROB CHEMOTHER 2017; 72 (1): 166—171.

Исследовали устойчивость к антимикробным препаратам и молекулярные характеристики бета-лактамаз (БЛРС, AmpC бета-лактамазы и карбапенемазы) штаммов Enterobacteriaceae, возбудителей инфекций брюшной полости (ИБП) у госпитали-

зированных больных в азиатско-тихоокеанском регионе (АТР) в период 2008—2014 гг. Для определения типов бета-лактамаз у 2893 штаммов с МПК эртапенема $>0,5$ мг/л использовали multiplex-ПЦР. Для большинства штаммов также фиксировали время выявления их в больнице. Уровень нечувствительности к имипенему среди 2728 (94,3%) штаммов Enterobacteriaceae с подтверждённой продукцией бета-лактамаз в АТР был низким (в среднем 7,9%), за исключением штаммов из Вьетнама (17,7%) и Филиппин (10,2%). Доминирующими типами БЛРС среди возбудителей ИБП были СТХ-М-15 и СТХ-М-14. Самыми многочисленными вариантами AmpC бета-лактамаз были *bla*_{CMY-2} у штаммов *Escherichia coli* и *bla*_{DHA-1} у штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Приобретение *bla*_{CMY-2} и *bla*_{DHA-1} аллелей штаммами Enterobacteriaceae, возбудителями ИБП, было в большей степени внебольничным (38,0% и 42,6%, соответственно). АСТ и MIR варианты AmpC были обнаружены, главным образом, в *Enterobacter species*. Штаммы *E.coli*, *K.pneumoniae* и *Enterobacter cloacae*, несущие *bla*_{NDM-1,4,5,7}, обычно идентифицировали среди возбудителей ИБП, выделенных во Вьетнаме и на Филиппинах, а штаммы с *bla*_{OXA-48} исключительно во Вьетнаме. Высокий уровень устойчивости требует активной политики контроля для преодоления негативной тенденции развития антибиотикоустойчивости среди видов Enterobacteriaceae, возбудителей ИБП.

* Departments of Laboratory Medicine and Internal Medicine, National Taiwan University Hospital, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan.

ВНЕБОЛЬНИЧНОЕ НОСИТЕЛЬСТВО БЛРС-ПРОДУЦЕНТОВ *ESCHERICHIA COLI*, АССОЦИИРУЕТСЯ СО ШТАММАМИ НИЗКОЙ ПАТОГЕННОСТИ: ШВЕДСКОЕ НАЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.

COMMUNITY CARRIAGE OF ESBL-PRODUCING
ESCHERICHIA COLI IS ASSOCIATED WITH STRAINS
OF LOW PATHOGENICITY: A SWEDISH NATIONWIDE
STUDY / S. NY, S. LÖFMARK, S. BÖRJESSON,
S. ENGLUND, M. RINGMAN, J. BERGSTRÖM,
P. NAUCLÉR, C. G. GISKE*, S. BYFORS // J ANTIMICROB
CHEMOTHER 2017; 72 (2): 582—588.

Внебольничное носительство БЛРС-продуцирующих штаммов *Escherichia coli* (Ec-БЛРС) является широко распространённым явлением, но необходимо было установить связь между носительством и инфекцией. Сравнивали молекулярные характеристики Ec-БЛРС у внебольничных носителей и штаммов, вызывающих инвазивные инфекции. В шведских общинах от рандомизировано отобран-

ных жителей было собрано 2134 фекальных проб, в которых было определено наличие Ec-БЛРС. Все добровольцы были опрошены о частных факторах риска носительства Ec-БЛРС. Ещё 418 штаммов *E.coli*, возбудителей инфекции кровотока (ИК), предполагаемых продуцентов БЛРС, были получены из шведских лабораторий. Все штаммы были гено- и фенотипированы. Результаты показали, что популяция Ec-БЛРС, полученная от носителей, характеризовалась низкой патогенностью по сравнению со штаммами, возбудителями ИК, соотношение штаммов *E.coli*, относящихся к филогруппе B2, ST131 и ST131 субклона H30-Rx, у носителей было низкое. У штаммов, выделенных от носителей, был более низкий уровень мультирезистентности. Показатель носительства Ec-БЛРС у здоровых шведских добровольцев составлял 4,7% (101/2134). Факторами риска, связанными с носительством, были путешествия в страны Азии (OR=3,6, 95% ДИ=1,4—9,2) и Африки (OR=3,6, 95% ДИ=1,7—7,7), диета, исключая свинину (OR=0,5, 95% ДИ=0,3—0,8 при употреблении свинины). Таким образом, факторы риска, ассоциированные с более высокой патогенностью, были более обычны при ИК, чем при носительстве. Это означает, что риск инвазивной Ec-БЛРС ИК может быть умеренным для многих носителей в общине, но в то же время носительство Ec-БЛРС штаммов высокого риска должно быть в центре внимания при профилактических мерах.

* Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Stockholm, Sweden.
Department of Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden.

СРАВНЕНИЕ ИСХОДОВ У БОЛЬНЫХ С БАКТЕРИЕМИЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ПРОДУЦИРУЮЩИМИ ИЛИ НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИМИ КАРБАПЕНЕМАЗУ УСТОЙЧИВЫМИ К КАРБАПЕНЕМАМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ ENTEROBACTERIACEAE.

COMPARING THE OUTCOMES OF PATIENTS
WITH CARBAPENEMASE-PRODUCING
AND NON-CARBAPENEMASE-PRODUCING
CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE
BACTEREMIA / P. D. TAMMA, K. E. GOODMAN,
A. D. HARRIS, T. TEKLE, A. ROBERTS, A. TAIWO,
P. J. SIMNER* // CLIN INFECT DIS 2017; 64 (3): 257—264.

Карбапенемоустойчивые энтеробактерии (КУЭ) как возбудители инфекций ассоциируются со значительным уровнем смертности. Поскольку существуют различные механизмы устойчивости к карбапенемам, остаётся невыясненным, зависят ли показатели смертности от механизма устойчивос-

ти, т.е. обладает ли механизм устойчивости прогностической информативностью. Было выполнено обсервационное сравнительное исследование показателей 14-дневной смертности у больных бактериемией, обусловленной продуцирующими карбапенемазу (КП) КУЭ и не продуцирующими карбапенемазу (не КП) КУЭ. На всех больных были собраны клинические данные. Идентификацию генов, кодирующих бета-лактамазы, у всех штаммов выполняли методом микрочипирования ДНК. За период исследования было установлено 83 уникальных эпизода монобактериальной КУЭ бактериемии: 37 (45%) КП-КУЭ и 46 (55%) не КП-КУЭ. Большинство КП-КУЭ штаммов содержали *bla*_{KPC} (92%), далее *bla*_{NDM} (5%) и *bla*_{OXA-48}-типа (3%). Значения МПК меропенема у КП-КУЭ штаммов были ≥ 16 мкг/мл, тогда как у не КП-КУЭ штаммов ≤ 1 мкг/мл ($p < 0,001$). Всего в течение 14 дней умерло 18 (22%) больных, в т.ч. 12 (32%) в группе КП-КУЭ и 6 (13%) в группе не КП-КУЭ. В соответствии с тяжестью бактериемии в 1-й день, сопутствующими медицинскими обстоятельствами и различной антибиотикотерапией, отношение рисков смертности у больных группы КП-КУЭ было более чем в 4 раза выше, чем в группе не КП-КУЭ (OR 4,92; 95% ДИ 1,01–24,81). Итак, можно полагать, что КП-КУЭ могут быть более вирулентными, чем не КП-КУЭ, и ассоциируются с более плохими исходами, что подчёркивает важность определения механизмов устойчивости КУЭ при выборе антибиотикотерапии.

* Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland.

**ПИПЕРАЦИЛЛИН/ТАЗОБАКТАМ
КАК АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ
КАРБАПЕНЕМАМИ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ МОЧЕВОГО
ТРАКТА, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ENTEROBACTERIACEAE,
ПРОДУЦЕНТАМИ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО
СПЕКТРА: IN SILICO ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ.**

**PIPERACILLIN/TAZOBACTAM AS AN ALTERNATIVE
ANTIBIOTIC THERAPY TO CARBAPENEMS
IN THE TREATMENT OF URINARY TRACT
INFECTIONS DUE TO EXTENDED-SPECTRUM
 β -LACTAMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE:
AN IN SILICO PHARMACOKINETIC STUDY/
H. GUET-REVILLET, E. TOMINI, A. EMIRIAN,
O. JOIN-LAMBERT, H. LÉCUYER, J.-R. ZAHAR*,
V. JULLIEN, // INT J ANTIMICROB AGENTS 2017;
49: 1: 62–66.**

Вопрос о пиперациллине/тазобактаме (ТЗП) как альтернативе карбапенемам при инфекциях, вы-

званных Enterobacteriaceae, продуцентами бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС-Е), остаётся спорным. На примере пиелонефрита оценивали возможности достижения целевых фармакодинамических (ФД) показателей в двух различных режимах ТЗП терапии при инфекциях, обусловленных продуцирующими БЛРС *Escherichia coli* (БЛРС-Ес) и *Klebsiella pneumoniae* (БЛРС-Кр). Были определены значения МПК у 144 штаммов БЛРС-Ес и 111 штаммов БЛРС-Кр, возбудителей пиелонефрита. Вероятность достижения ФД показателей (50% *fT* > МПК и 100% *fT* > МПК) при дозах ТЗП 4 г/каждые 8 ч и 4,5 г/каждые 6 ч в виде короткой (1 ч) или пролонгированной (4 ч) инфузии, или 12–18 г/сут в виде длительной (суточной) инфузии определяли, используя 2 известные популяционные фармакокинетические модели и метод Монте Карло. Только 133 БЛРС-Ес и 74 БЛРС-Кр штамма, чувствительные к ТЗП и имеющие значения МПК, обеспечивающие необходимый диаметр зоны подавления, были пригодны для моделирования. Результаты, полученные на двух моделях, были сходными, но только пролонгированная и длительная инфузии позволяли достичь с 90% вероятностью 50% *fT* > МПК независимо от вида бактерии. Результат 100% *fT* > МПК с 70% вероятностью в отношении популяции БЛРС-Ес мог быть достигнут только при комбинации длительной и пролонгированной инфузии с максимальной дозой антибиотика. Достижение 100% *fT* > МПК с >90% вероятностью в отношении БЛРС-Кр было возможно только в режиме длительной инфузии дозы 18 г/сут. ТЗП может использоваться при пиелонефрите лёгкой формы, вызванном чувствительными БЛРС-Ес при подтверждении оптимальности выбранного режима введения антибиотика. Риск неудачи терапии в случае тяжёлой формы БЛРС-Кр пиелонефрита может быть выше, что свидетельствует в пользу применения длительной инфузии.

*Laboratoire de microbiologie, Hôpital Avicenne, 125 rue Stalingrad, 93000 Bobigny, France.

**ВОЗВРАЩЕНИЕ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
БЕТАЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ, НО В КАЧЕСТВЕ
АНТИВИРУЛЕНТНЫХ СРЕДСТВ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ,
ВЫЗВАННЫХ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫМ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

**REDEPLOYING β -LACTAM ANTIBIOTICS AS A NOVEL
ANTIVIRULENCE STRATEGY FOR THE TREATMENT OF
METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS
INFECTIONS / E. M. WATERS, J. K. RUDKIN,
S. COUGHLAN, G. C. CLAIR, J. N. ADKINS, S. GORE,
G. XIA, N. S. BLACK, T. DOWNING, E. O'NEILL,
A. KADIOGLU, J. P. O'GARA* // J. INFECT. DIS. (2017)
215 (1): 80–87.**

Инновационное применение существующих антибиотиков является важным стратегическим подходом, направленным на преодоление нарастающего кризиса, вызванного антибиотикоустойчивостью. Сообщается о новом подходе в лечении MRSA инфекций, продемонстрировавшем значительное ослабление вирулентности MRSA оксациллином, несмотря на устойчивость патогена к антибиотику. Методами *in vitro* и на *in vivo* моделях инвазивной пневмонии и сепсиса было показано, что у обработанных оксациллином штаммов MRSA вирулентность была значительно ослаблена. Этот эффект базируется преимущественно на оксациллинозависимой репрессии системы кворум-сенсинга, регулируемой дополнительным геном, и изменении строения клеточной стенки, что, в свою очередь, ведёт к повышению чувствительности бактерий к защитной бактерицидной системе хозяина. Полученные данные означают, что беталактамы антибиотиков в качестве вспомогательных антивирулентных агентов следует включать в режим лечения больных с MRSA инфекциями. Этот подход представляет важное изменение лечения MRSA инфекций в современной клинической практике, значительно улучшающее исход болезни безопасным и недорогим способом.

*Department of Microbiology, National University of Ireland, Galway, Ireland.

КЛИНДАМИЦИН ВЛИЯЕТ НА ВИРУЛЕНТНЫЕ ФАКТОРЫ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А И УЛУЧШАЕТ КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ.

CLINDAMYCIN AFFECTS GROUP A STREPTOCOCCUS VIRULENCE FACTORS AND IMPROVES CLINICAL OUTCOME / F. ANDREONI, C. ZÜRCHER, A. TARNUTZER, K. SCHILCHER, A. NEFF, N. KELLER, E. M. MAGGIO, C. POYART, R. A. SCHUEPBACH, A.S. ZINKERNAGEL* // J INFECT DIS 2017; 215 (2): 269–277.

Стрептококки группы А (GAS) обладают целым арсеналом вирулентных факторов, усугубляющих такие жизнеугрожающие инфекции, как некротизирующий фасцит (НФ). Современные терапевтические режимы включают хирургическую обработку раны и лечение антибиотиками, активными в отношении клеточной стенки патогена. Несмотря на отсутствие доказательности клинической эффективности, рекомендовано при лечении добавление клиндамицина. Как показали обсервационные исследования, клиндамицин (КЛИ), был назначен только 63% больных с тяжёлой GAS инвазивной инфекцией, что отражает существующую клиническую дилемму. Задачей настоящего исследования было определить, улучшает ли КЛИ

исход лечения НФ за счёт модуляции вирулентных факторов у КЛИ-чувствительных и КЛИ-устойчивых штаммов GAS *in vitro* и *in vivo*. Обработка КЛИ *in vivo* снижала активность ДНК Sda1 и стрептолизина О (SLO), тогда как *in vitro* в субингибиторных концентрациях КЛИ индуцировал экспрессию и активность SLO, ДНКазы и протеазы клеточной оболочки *Streptococcus pyogenes*. По результатам экспериментов *in vivo*, можно предполагать, что КЛИ следует вводить больным НФ как можно раньше, а исследования *in vitro* подчёркивают существенное значение высоких доз КЛИ.

* Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital Zurich, University Zurich, Rämistr. 100, Zürich 8091, Switzerland.

ПОНИМАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ОСТРОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ НА PSEUDOMONAS AERUGINOSA ИНФЕКЦИЮ: РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ И МУЛЬТИУСТОЙЧИВЫМИ ШТАММАМИ НА МОДЕЛИ ПЕРИТОНИТА У МЫШЕЙ.

UNDERSTANDING THE ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE TO PSEUDOMONAS AERUGINOSA INFECTION: DIFFERENCES BETWEEN SUSCEPTIBLE AND MULTIDRUG-RESISTANT STRAINS IN A MOUSE PERITONITIS MODEL / S. GÓMEZ-ZORRILLA, L. CALATAYUD, C. JUAN, G. CABOT, F. TUBAU, A. OLIVER, M. A. DOMINGUEZ, J. ARIZA, C. PEÑA* // INT J ANTIMICROB AGENTS 2017; 49: 2: 198–203.

Нарастающее число штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) связано с распространением нескольких международных эпидемических клонов, т.н. клонов высокого риска. Связь между МЛУ и состоянием фитнеса остаётся невыясненной, также мало известно о воспалительной реакции хозяина на острые *P.aeruginosa* инфекции. Исследовали воспалительный отклик на штаммы, относящиеся к наиболее важным клонам высокого риска, и сравнивали с ответной реакцией на клинические чувствительные штаммы. Были изучены 9 штаммов *P.aeruginosa*, в т.ч. наиболее клинически важных клонов высокого риска с МЛУ (ST111, ST175 и ST235). Воспалительный отклик, выраженный выделением в сыворотку интерлейкинов, исследовали на модельном перитоните-сепсисе у мышей на 4, 8 и 12 ч. Уровни α -фактора некроза опухолей (TNF α) и интерлейкина-10 (IL-10) были значительно выше во всех 3 временных точках у мышей, инфицированных чувствительными штаммами, по сравнению с животными, инокулированными МЛУ штаммами. Уровни IL-6 на 8 и 12 ч были выше в случае клинических чувствительных штаммов ($p=0,036$ и $p=0,007$, соответственно). Количество

бактерий (log КОЕ/мл) в перитонеальной жидкости было выше у клинических чувствительных штаммов, чем в группе МЛУ штаммов на 8 ч [6,00 (4,30—6,90) против 4,46 (3,30—5,34); $p=0,005$] и 12 ч [7,75 (4,00—7,97) против 4,04 (2,58—4,94); $p=0,003$]. МЛУ штаммы *P.aeruginosa* вызывали более слабый воспалительный отклик, чем чувствительные штаммы на экспериментальной модели инфекции у мышей, что может свидетельствовать о связи между фитнесом и множественной устойчивостью.

* Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Feixa Llarga s/n 08907, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

ГЛИКОЗИД ГИДРОЛАЗЫ РАЗРУШАЮТ ПОЛИМИКРОБНЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЁНКИ В РАНАХ.

GLYCOSIDE HYDROLASES DEGRADE POLYMICROBIAL BACTERIAL BIOFILMS IN WOUNDS / D. FLEMING, L. CHANIN*, K. RUMBAUGH* // ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER FEBRUARY 2017; 61: 2 E01998—16.

Персистирующий характер хронических ран делает их очень чувствительными к инфицированию различными патогенами, способными вырабатывать внеклеточные полимерные соединения (ВПС). Эти ВПС делают бактериальную популяцию, т.е. биоплёнку, более чем в 1000 раз толерантнее к антибиотикам по сравнению с планктонными клетками, а излечение раны очень трудным. На соединения, способные разрушать биоплёнки, не затрагивая ткани хозяина, существует большой спрос в клинике. Была проверена эффективность разрушения биоплёнок *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в моно- и смешанной культуре двумя гликозид гидролазами, α -амилазой и целлюлазой, гидролизующими комплекс полисахаридов. Предполагалось, что обработка гликозид гидролазами будет значительно снижать биомассу ВПС и переводить бактерии в планктонное состояние, делая их более чувствительными к антимикробным агентам. Действительно, обработка биоплёнок *S.aureus* и *P.aeruginosa*, выросших в условиях *in vitro* и *in vivo*, растворами α -амилазы и целлюлазы приводила к существенному снижению биомассы, растворению биоплёнки и повышению эффективности последующей обработки антибиотиками. Итак, согласно полученным результатам, обработка гликозид гидролазами представляет безопасный, эффективный новый способ лечения инфекций, сопровождающихся образованием биоплёнок.

*Department of Surgery, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, Texas, USA

*Department of Immunology and Molecular Microbiology, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, Texas, USA.

*TTUHSC Surgery Burn Center of Research Excellence, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, Texas, USA.

ПРОТИВОГРИБКОВОЕ ДЕЙСТВИЕ ФИТОСОЕДИНЕНИЙ НА *CANDIDA* SPP. ПО ОТДЕЛЬНОСТИ И В КОМБИНАЦИИ С ФЛУКОНАЗОЛОМ.

ANTIFUNGAL EFFECTS OF PHYTOCOMPOUNDS ON *CANDIDA* SPECIES ALONE AND IN COMBINATION WITH FLUCONAZOLE / M. LU, T. LI, J. WAN, X. LI, L.YUAN, S. SUN* // INT J ANTIMICROB AGENTS FEBRUARY 2017; 49: 2: 125—136.

Инвазивные инфекции, вызванные *Candida* spp., доминируют среди внутрибольничных грибковых инфекций. Из-за возрастающего применения противогрибковых препаратов часто возникает устойчивость *Candida* spp. к антимикотикам, в частности к флуконазолу (ФЛК). Были предприняты попытки изыскать новые антимикотики или соединения, усиливающие чувствительность *Candida* spp. к существующим антимикотикам. Вторичные метаболиты растений представляют важный источник огромного числа новых лекарственных веществ и соединений, пригодных для последующей модификации. В последние годы было выполнено исследование антикандидозной активности фитосоединений, и в результате была выявлена серия фитосоединений с антикандидозными свойствами, как-то фенилпропаноиды, флавоноиды, терпеноиды и алкалоиды. Некоторые из этих соединений демонстрировали высокую противогрибковую активность (МПК ≤ 8 мкг/мл), некоторые, а именно, хонокиол, магнолол и шиконин, были эффективнее ФЛК и итраконазола в отношении лекарственноустойчивых *Candida* spp. Интересно, что некоторые фитосоединения не только проявляли антикандидозную активность, но и синергидный эффект с ФЛК, приводящий к восстановлению чувствительности к ФЛК. В обзоре суммированы данные по антикандидозной активности фитосоединений и взаимодействию их с ФЛК. Кроме того, широко обсуждены механизмы синергизма и структура антимикотических фитосоединений. Представленный анализ может служить основой для открытия противогрибковых агентов и разработки новых подходов в преодолении устойчивости к антимикотикам.

*Department of Pharmacy, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong Province 250014, China. Fax: +86 531 8296 1267.

Подготовлено Н. С. Бондаревой (Москва)

Памяти А. Н. Полина

In Memory A. N. Polin

14 марта 2017 года ушёл из жизни ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета профессор Анатолий Николаевич Полин.

Вся взрослая жизнь А. Н. Полина была связана с Московским университетом: здесь он получил диплом специалиста-микробиолога, прошёл путь от лаборанта до заведующего лабораторией, защитил кандидатскую и докторскую диссертации, стал профессором.

С самого начала своей научной деятельности А. Н. Полин занимался проблемами в области антибиотиков, изучая биосинтез этих соединений, механизмы их действия, механизмы микробной резистентности к антибиотикам.

Анатолий Николаевич руководил исследованиями по изучению антибактериального действия полипептидных антибиотиков, а также антибиотиков гелиомицина и неотеломицина. В течение ряда лет при его непосредственном участии проводилось изучение механизма резистентности бактерий, обусловленного изменениями в клеточной стенке при развитии у микроорганизмов антибиотикоустойчивости.

А. Н. Полин всегда живо интересовался современными течениями в исследовании биологически активных веществ: поиском новых продуцентов (в том числе среди морских микроорганизмов) и новых биологически активных соединений; развитием представлений о глобальной резистоме, об экологической роли антибиотиков как сигнальных молекул; вопросами, связанными с наличием процессов апоптоза у стрептомицетов. Несколько обзоров литературы по этим вопросам были опубликованы А.Н.Полиным в соавторстве с сотрудниками, в том числе на страницах журнала «Антибиотики и химиотерапия».



А. Н. Полин был членом Учёного совета биологического факультета МГУ, членом Учёного совета Института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе.

А. Н. Полин был членом редакционного совета журнала «Антибиотики и химиотерапия», а также — Комиссии по новым антибиотикам при Президиуме АМН СССР.

Много времени отдавал А. Н. Полин общественной и учебно-педагогической работе, на протяжении многих лет возглавлял приёмную комиссию сначала Биолого-почвенного факультета МГУ, а затем и приёмную комиссию Московского университета.

В течение последних лет А. Н. Полин был председателем Совета ветеранов биологического факультета МГУ, всегда проявляя большую заботу о ветеранах. А. Н. Полин принимал самое активное участие в создании опубликованной к 70-летию Победы в Великой Отечественной войне книги «Дорогами победы», посвящённой биологам МГУ — фронтовикам и труженикам тыла.

Редколлегия и редакционный совет журнала «Антибиотики и химиотерапия» выражает глубокое соболезнование родным и близким Анатолия Николаевича Полина и вместе с ними скорбит о его безвременной кончине.

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

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

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

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

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

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

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

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

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

графиков и диаграмм отмечается, что дано по осям координат на приведенных кривых и т. п.

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

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

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

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

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

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

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

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

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

кагоцел®
противовирусное средство

Работает

даже при запоздалом лечении!



Кагоцел® – выбор специалистов!¹

№1

СРЕДИ
ПРЕПАРАТОВ
ОТ ПРОСТУДЫ
И ГРИППА²

- **Кагоцел®** эффективен при приеме вплоть до четвертого дня от начала появления первых симптомов ОРВИ и гриппа.
- **Кагоцел®** быстро улучшает самочувствие и сокращает продолжительность клинических симптомов гриппа и ОРВИ вне зависимости от этиологии заболевания.
- **Кагоцел®** входит в СТАНДАРТЫ МИНЗДРАВА РФ по оказанию специализированной медицинской помощи при гриппе средней и тяжелой степени тяжести³.
- Профилактический 4-недельный курс приема **Кагоцела** способствует снижению частоты возникновения ОРВИ и гриппа в 3 раза, а также достоверно снижает число осложнений в 5 раз⁴.
- **Кагоцел®** имеет высокий профиль безопасности.

Современный противовирусный препарат для взрослых и детей с 3 лет

¹ По результатам голосования российских врачей в рамках премии «Russian Pharma Awards 2015» Кагоцел® – самый назначаемый препарат при профилактике и лечении ОРВИ и гриппа; по результатам голосования специалистов аптечной индустрии в рамках премии «Зеленый крест 2015» Кагоцел® – лучший безрецептурный препарат. ² По данным ЗАО «Группа ДСМ», Кагоцел® – самый популярный противовирусный препарат от простуды и гриппа в РФ в 2015 г., в упаковках. ³ Приказ Министерства здравоохранения РФ от 9 ноября 2012 г.: № 724н, № 842н. ⁴ Лыткина И.Н., Малышев Н.А. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций среди эпидемиологически значимых групп населения // Лечащий врач. – 2010. – № 10. – С. 66–69.

Реклама



Подробную информацию вы можете получить на сайте: www.kagocel.ru

ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12. Тел./факс: +7 (495) 741-49-89.
Рег. уд. Р N002027/01 от 19.11.2007.

Информация предназначена для медицинских и фармацевтических работников.