

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 57



1-2'2012

Научно-практический журнал

Алексан® (Цитарабин)
Доксорубин-Эбеве
Кальциумфолинат-Эбеве
Карбоплатин-Эбеве
Метотрексат-Эбеве
Оксалиплатин-Эбеве
Паклитаксел-Эбеве
Тамоксифен-Эбеве
Цисплатин-Эбеве
Эпирубицин-Эбеве
Этопозид-Эбеве
5-Фторурацил-Эбеве
Трамадол

Европейское
производство

Удобные
и экономичные
флаконы

Широкий ассортимент
готовых к применению
цитостатиков для
химиотерапии

 The comprehensive approach

Рег. номера: П N 015197/01, ЛСР-009900/08, П N 016185/01, П N 015232/01,
П N 014892/01-2003, П N 014892/02-2003, П N 014892/03-2003, П N 015198/01-2003,
П N 015106/01-2003, П N 015188/01-2003, П N 015975/01, П N 015174/01-2003,
П N 015225/02, П N 015225/03, П N 015225/01, П N 015178/01-2003, П N 015731/04

ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ ПРЕПАРАТА ОЗНАКОМЬТЕСЬ, ПОЖАЛУЙСТА, С ПОЛНОЙ ИНСТРУКЦИЕЙ.
МАТЕРИАЛ ПРЕДНАЗНАЧЕН ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ (ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ) РАБОТНИКОВ.

123317 Москва
Пресненская набережная,
д. 8, строение 1
комплекс «Город столиц»
8-9 этаж, ЗАО «Сандоз»
тел.: (495) 660-75-09

a Novartis company

реклама

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»
Published 12 times a year
Founded in 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
Л. И. Гусак

Подписка по каталогу Роспечать:

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

*Подписка через объединенный 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 2011

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 57

1—2'2012

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.

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. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Член-корр РАМН, проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев В. П.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Оригинальные статьи

Кирилюк И. А., Святченко В. А., Морозов Д. А.,
Казачинская Е. И., Киселев Н. Н., Бакунова С. М.,
Войнов М. А., Локтев В. Б., Григорьев И. А.
Цитотоксичность нитроксильных радикалов
в отношении опухолевых и диплоидных клеток человека
in vitro и оценка их противовирусной активности
Абрамович Р. А., Быков В. А., Елагина И. А.,
Папазова Н. А., Воробьев А. Н.
Научные подходы к разработке комбинированной
лекарственной формы на основе
биотехнологической субстанции
Суханов Д. С., Виноградова Т. И., Елькин А. В.,
Заболотных Н. В., Васильева С. Н., Витовская М. Л.
Изучение эффективности ремаксола в условиях
комплексной терапии экспериментального
генерализованного туберкулеза у мышей

В помощь практикующему врачу

Кантемирова Б. И., Чернышева А. Х.,
Стародубцев А. К., Сычев Д. А.
Изучение фенотипической активности
изофермента CYP3A4 у детей
Шерышева Ю. В., Галимзянов Х. М., Коваленко А. Л.
Оценка безопасности и фармакотерапевтической
эффективности применения циклоферона
для лечения астраханской риккетсиозной лихорадки
Стражев С. В., Копосов П. В., Белоногов А. В.
Вопросы реабилитации и профилактики нежелательных
явлений у больных, страдающих раком молочной железы
и получающих антиэстрогенную терапию

Стандартизация и контроль лекарственных средств

Васильев А. Н.
Качественные доклинические исследования —
необходимый этап разработки и внедрения
в клиническую практику
новых лекарственных препаратов

Обзоры

Богущ Т. А., Дудко Е. А., Богущ Е. А.,
Полоцкий Б. Е., Тюляндин С. А., Давыдов М. И.
Молекулярные мишени тамоксифена,
отличные от эстрогеновых рецепторов

По страницам журналов

Original Papers

- 3** Kirilyuk I. A., Svyatchenko V. A., Morozov D. A.,
Kazachinskaya E. I., Kiselev N. N., Bakunova S. M.,
Voinov M. A., Loktev V. B., Grigoryev I. A.
In vitro Cytotoxicity of Nitroxyl Radicals with Respect
to Tumor and Diploid Human Cells
and Estimation of Their Antiviral Activity
- 13** Abramovich R. A., Bykov V. A., Elagina I. A.,
Papazona N. A., Vorobyev A. N.
Scientific Approaches to Development
of Medicinal Formulation Based
on Biotechnological Substance
- 17** Sukhanov D. S., Vinogradova T. I., Elkin A. V.,
Zabolotnykh N. V., Vasilyeva S. N., Vitovskaya M. L.
Investigation of Remaxol Efficacy
in Complex Therapy of Experimental Generalized
Tuberculosis on Mice

Guidelines for Practitioners

- 23** Kantemirova B. I., Chernysheva A. H.,
Starodubtsev A. K., Sychev D. A.
Studying of Fenotipichesky Activity
Isoenzyme CYP3A4 in Children
- 26** Sherysheva Yu. V., Galimzyanov Kh. M., Kovalenko A. L.
Evaluation of Safety and Pharmacotherapeutic Efficacy
of Cycloferon in Treatment
of Astrakhan Rickettsial Fever
- 32** Strazhev S. V., Kuposov P. V., Belonogov A. V.
Problems of Rehabilitation and Prophylaxis
of Adverse Reactions to Antiestrogen Therapy
in Patients with Breast Cancer

Standardization and Control of Drugs

- 41** Vasiliev A. N.
Good Preclinical Study,
as an Obligatory Stage in Design
and Clinical Use of New Medicinal Preparations

Reviews

- 50** Bogush T. A., Dudko E. A., Bogush E. A.,
Polotsky B. E., Tyulyandin S. A., Davydov M. I.
Tamoxifen Molecular Targets Different
From Estrogen Receptors

Abstracts

* 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.

Цитотоксичность нитроксильных радикалов в отношении опухолевых и диплоидных клеток человека *in vitro* и оценка их противовирусной активности

И. А. КИРИЛЮК¹, В. А. СВЯТЧЕНКО², Д. А. МОРОЗОВ¹, Е. И. КАЗАЧИНСКАЯ², Н. Н. КИСЕЛЕВ², С. М. БАКУНОВА¹, М. А. ВОЙНОВ¹, В. Б. ЛОКТЕВ², И. А. ГРИГОРЬЕВ¹

¹ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской области

In vitro Cytotoxicity of Nitroxyl Radicals with Respect to Tumor and Diploid Human Cells and Estimation of Their Antiviral Activity

I. A. KIRILYUK, V. A. SVYATCHENKO, D. A. MOROZOV, E. I. KAZACHINSKAYA, N. N. KISELEV, S. M. BAKUNOVA, M. A. VOINOV, V. B. LOKTEV, I. A. GRIGORYEV

N.N.Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry,

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

State Scientific Centre of Virology and Biotechnology Vektor, Koltsovo, Novosibirsk Region

Проведён химический синтез 39 водорастворимых нитроксильных радикалов различных классов, относящихся к радикалам пиперидинового, пирролидинового и имидазолидинового рядов. Среди 39 исследованных нитроксильных радикалов 27 препаратов обладают цитотоксичностью *in vitro* в отношении культуры опухолевых клеток A431. Наиболее активные нитроксильные радикалы имели CC_{50} для клеток SW480 и A431 в пределах 0,16–2,5 мМ при индексе селективности 3,91–7,81 по отношению цитотоксичности препаратов к клеткам нормального фенотипа L68 и опухолевым клеткам. Тестирование противовирусной активности показало, что 16 и 22 нитроксильных радикалов проявляют противовирусную активность в культуре клеток Vero в отношении вируса Западного Нила и вируса простого герпеса второго типа соответственно, а EC_{50} колебалась в пределах 0,09–3,45 мМ. Некоторые нитроксильные радикалы обладают только противовирусной активностью, а ряд соединений проявляли цитотоксичность и противовирусную активность одновременно.

Ключевые слова: нитроксильные радикалы, цитотоксичность, противовирусная активность, опухолевые клетки.

Thirty nine water soluble nitroxyl radicals of various classes, belonging to piperidine, pyrrolidine and imidazolidine series were synthesized. Twenty seven of them were cytotoxic *in vitro* with respect to the tumor cell culture A431. The CC_{50} of the most active nitroxyl radicals with respect to cells SW480 and A431 was within 0.16–2.5 mM at the selectivity index of 3.91–7.81 in relation to cytotoxicity of the compounds for the cells of the normal L68 phenotype and tumor cells. The tests on the antiviral activity showed that 16 out of 22 nitroxyl radicals had antiviral activity in Vero cell culture with respect to the West Nile virus and *Herpes simplex* virus of type II respectively. The EC_{50} ranged within 0.09–3.45 mM. Some of the nitroxyl radicals had only antiviral activity, but a number of the compounds had both cytotoxic properties and antiviral activity.

Key words: nitroxyl radicals, cytotoxicity, antiviral activity, tumor cells.

Введение

Нитроксильные радикалы — обширный класс стабильных органических радикалов, который уже много лет используется в биофизических исследованиях благодаря устойчивости и простому спектру электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), чувствительному к различным параметрам окружения [1]. Устойчивый парамагнетизм нитроксильных радикалов делает возможным их использование в качестве контрастирующих агентов

в ядерной магнитной томографии, а также спиновых зондов в различных модификациях ЭПР-спектроскопии и ЭПР-томографии [2–4]. Другое важное качество нитроксильных радикалов — их выраженные антиоксидантные свойства [2, 5]. В настоящее время признано, что одним из факторов ответственных за возникновение и развитие различных форм злокачественных новообразований является окислительное поражение клеток тканей, включая повреждение ДНК во время окислительного стресса [6]. Показано, что нитроксильные радикалы, модифицируя окислительный стресс и изменяя окислительно-восстановительный статус тканей, способны изменять

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 630090 Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 9. Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова

многие метаболические процессы. Например, нитроксильные радикалы активизируют процесс апоптоза опухолевых клеток [7]. Нитроксильный радикал TEMPOL (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил, 1) при использовании совместно с химиопрепаратами доксорубицином или митохондриальным ингибитором потенцирует противоопухолевый эффект *in vivo*, что выражается в более эффективном подавлении роста клеток карциномы простаты человека, привитых бестимусным мышам [8]. Показана также перспективность применения нитроксильных радикалов при проведении радиотерапии злокачественных новообразований [9].

Биологическая активность нитроксильных радикалов может определяться не только свойствами нитроксильного фрагмента, но и наличием фармакофорных фрагментов в составе их молекул или в составе молекул их метаболитов. Присоединение нитроксильных фрагментов к молекулам известных биологически активных соединений, в том числе противораковых препаратов, по-разному влияет на противораковую активность таких спин-меченных препаратов [10–16]. В то же время некоторые проявления биологической активности нитроксильных радикалов, например TEMPOL, могут быть не связаны со свободно-радикальной природой соединений [17].

В данной работе представлены результаты исследования цитотоксической активности панели синтезированных нитроксильных радикалов в отношении опухолевых и диплоидных клеток человека *in vitro* и оценка их противовирусной активности в отношении ДНК-содержащего вируса простого герпеса второго типа (ВПГ-2) и РНК-содержащего вируса Западного Нила (ВЗН).

Материал и методы

Нитроксильные радикалы. Синтез нитроксильных радикалов, представленных в таблице 1, соединений 1–8 [18], 9 [39], 10 [19], 11 [20], 12 [6], 13 [21], 14 [22], 15 [23], 16 [24], 17 [25], 18–19 [26], 20 [27], 21 [28], 22 [29], 23 [30], 24 [31], 25–27 [7], 28 [32], 29–31 [33] осуществляли в соответствии с методиками, приведёнными в литературе. Использовали аналитические образцы или образцы с СОВ не менее 97% по данным ВЭЖХ. ИК-спектры препаратов определяли на спектрометре Bruker Vector 22 FT-IR в KBr при концентрации 1:150 или в тонком слое. УФ спектры снимались на приборе HP Agilent 8453 в EtOH (10^{-4} М растворы). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записаны на спектрометрах Bruker AV300 и AV400 в 5–10% растворах при температуре 300 К. В качестве стандарта использовали сигнал растворителя. Температуры плавления определены на микронагревательном столике Кофлера. Контроль за ходом реакций осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Sorbfil UV-254. Для хроматографической очистки полученных веществ использовали силикагель для колоночной хроматографии Kieselgel 60 (Merck).

Исследуемые соединения растворяли в 1 мл физиологического раствора из расчёта получения 100 мМ исходных растворов. Нерастворимые в физиологическом растворе соединения растворяли в ДМСО. Для нескольких соединений готовились исходные растворы меньшей концентрации: 30 и 32–25 мМ, 39–50 мМ.

Клеточные линии. В исследовании использовали культуры опухолевых клеток A431 (клетки эпидермоидной карциномы человека) и SW480 (клетки аденокарциномы толстой кишки человека), а также культуры клеток L68 (диплоидная культура клеток лёгкого человека) и Vero (перевиваемая культура клеток почки зелёной мартышки). Клетки культивировали в среде Игла ДЕМ (Gibco BRL), содержащей 5–10% эмбриональной сыворотки телёнка (Gibco BRL), 2 мМ L-глутамина, 80 мкг/мл гентамицина сульфата при 37°C в культуральных пластиковых флаконах (Costar, США).

Исследование цитотоксической активности соединений в отношении опухолевых клеток *in vitro* (MTT-тест). МTT-тест выполняли по методике, описанной в [34] с использованием клеток A431, SW480 или L68. Каждая экспериментальная точка выполнялась в трёх повторностях. Учёт результатов проводили на микропланшетном спектрофотометре Multiscan при длине волны 492 нМ. Значения 50% цитотоксической концентрации (CC_{50}) рассчитывали согласно [34].

Исследование противовирусной активности препаратов. Штамм Eg101 ВЗН был получен из коллекции вирусных препаратов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского. Штамм MS ВПГ-2 был получен из Американской коллекции типовых культур. Вирусы культивировали на культуре клеток Vero в среде Игла-МЕМ с содержанием 2% эмбриональной сыворотки. Титрование инфекционной активности ВПГ-2 и ВЗН проводили, как описано [35, 36]. Противовирусную активность исследуемых соединений *in vitro* оценивали в соответствии с [37].

Результаты и обсуждение

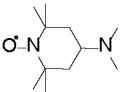
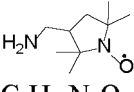
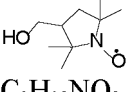
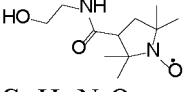
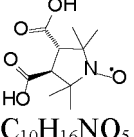
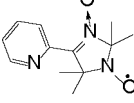
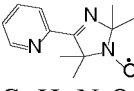
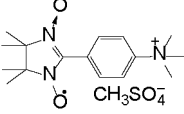
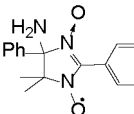
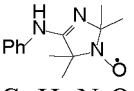
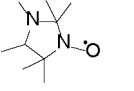
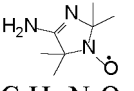
Нитроксильные радикалы. В работе использована серия водорастворимых нитроксильных радикалов различных классов 1–39 (табл. 1). Для придания гидрофильности исследуемым соединениям использовались карбоксильная группа, аминугуанидиновый фрагмент или спиртовые группы. На рисунке 1а–е приведены схемы синтезов для оригинальных соединений 32–39. Соединение 33 (рис. 1 а) получали по аналогии с разработанными ранее методиками синтеза производных 4-амино-2,5-дигидроимидазол-1-оксидов [38]. Для этого 4,4-диметил-2-(2-пиридил)-4Н-имидазол-5-карбонитрил-3-оксид (40) обрабатывали 4-метиламино-2,2,6,6-тетраметилпиперидином (41). В соответствии с литературными данными, взаимодействие приводит к замещению цианогруппы, причём в качестве нуклеофила выступает менее стерически затруднённый метиламиновый фрагмент. Полученный 4Н-имидазол-3-оксид 42 обрабатывали этилмагнийбромидом, и образовавшийся после разложения избытка реактива Гриньяра водой гидроксиламин 43 без выделения окисляли диоксидом свинца в соответствующий нитроксильный радикал 33.

По аналогии с литературной методикой синтеза 3-((3-карбоксипропанамидо)-метил)-2,2,5,5-тетраметилпиперидин-1-оксида (9) [39] ацилированием 3-аминометил-проксила (13) янтарным ангидридом получали нитроксильный радикал 34 (рис. 1 а). Трифенилфосфониевую соль 35 получали из того же аминометильного производного 13 по аналогии с методикой получения нитроксильного радикала 14 [40]. Для этого амин 13 сначала

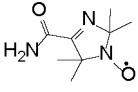
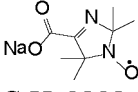
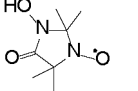
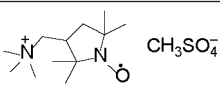
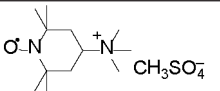
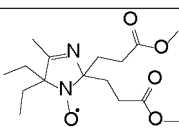
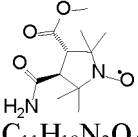
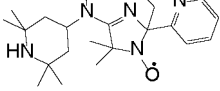
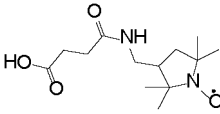
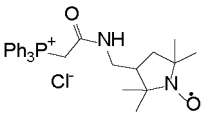
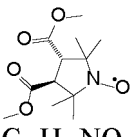
Таблица 1. Определение цитотоксичности исследуемых соединений в отношении опухолевых клеток А431 и исследование антивирусной активности нитроксильных радикалов в отношении ВЗН и ВПГ-2 *in vitro*

Соединение	Химическая формула	Цитотоксичность ($CC_{50} \pm SE$, мМ)	Вirus ингибирующая активность ($EC_{50} \pm SE$, мМ)	
			ВЗН	ВПГ-2
1	 $C_9H_{18}NO_2$	$1,25 \pm 0,20$	—	—
2	 $C_9H_{16}NO_2$	$0,63 \pm 0,07$	$1,14 \pm 0,35$	$1,38 \pm 0,40$
3	 $C_{11}H_{21}N_2O_2$	$1,25 \pm 0,15$	—	—
4	 $C_9H_{17}N_2O_2$	$> 10,00$	—	—
5	 $C_9H_{16}NO_3$	$2,50 \pm 0,23$	—	—
6	 $C_9H_{15}N_2O_2$	$5,00 \pm 0,35$	$1,79 \pm 0,45$	$1,28 \pm 0,30$
7	 $C_9H_{14}NO_3$	$> 10,00$	н. и.	$0,53 \pm 0,15$
8	 $C_9H_{17}N_2O_2$	$2,50 \pm 0,25$	$1,30 \pm 0,25$	$0,51 \pm 0,10$
9	 $C_{13}H_{23}N_2O_4$	$> 10,00$	н. и.	$0,23 \pm 0,14$
10	 $C_{13}H_{21}N_2O_4$	$1,25 \pm 0,13$	н.и	$0,22 \pm 0,08$
11	 $C_{10}H_{19}N_2O_3$	$2,50 \pm 0,22$	$3,45 \pm 0,84$	—
12	 $C_{29}H_{35}ClN_2O_2P \times H_2O$	$0,63 \pm 0,06$	—	—

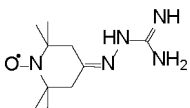
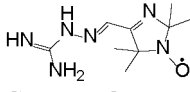
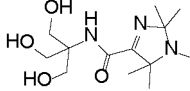
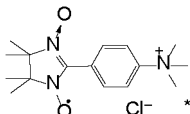
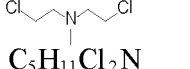
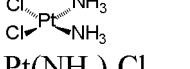
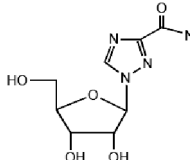
Продолжение табл. 1.

Соединение	Химическая формула	Цитотоксичность (CC ₅₀ ± SE, мМ)	Вirus ингибирующая активность (EC ₅₀ ± SE, мМ)	
			ВЗН	ВПГ-2
13	 C₁₁H₂₃N₂O	1,25±0,10	0,73±0,35	—
14	 C₉H₁₉N₂O	10,00±0,70	—	—
15	 C₉H₁₈NO₂	> 10,00	1,90±0,55	0,21±0,14
16	 C₁₁H₂₁N₂O₃	> 10,00	1,43±0,40	1,02±0,35
17	 C₁₀H₁₆NO₅	2,50±0,22	—	—
18	 C₁₂H₁₆N₃O₂	2,50±0,28	—	0,64±0,25
19	 C₁₂H₁₆N₃O	0,63±0,08	н.и	0,54±0,15
20	 C₁₇H₂₈N₃O₆S	1,25±0,12	1,86±0,52	0,12±0,05
21	 C₁₆H₁₇N₄O₂	2,50±0,30	0,24±0,10	0,32±0,12
22	 C₁₃H₁₈N₃O·HCl	0,32±0,02	>0,15	>0,15
23	 C₉H₁₉N₂O	10,00±0,63	—	—
24	 C₇H₁₄N₃O	1,25±0,18	0,16±0,07	—

Продолжение табл. 1.

Соединение	Химическая формула	Цитотоксичность (CC ₅₀ ± SE, мМ)	Вirus ингибирующая активность (EC ₅₀ ± SE, мМ)	
			ВЗН	ВПГ-2
25	 C ₈ H ₁₄ N ₃ O ₂	0,63±0,04	н.и	0,64±0,22
26	 C ₈ H ₁₂ N ₂ NaO ₃	> 10,00	0,60±0,20	—
27	 C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₃	2,5±0,22	н.и	0,34±0,12
28	 C ₁₃ H ₂₉ N ₂ O ₅ S	> 10,00	н.и	0,11±0,05
29	 C ₁₃ H ₂₉ N ₂ O ₅ S	>10,00	3,07±0,57	—
30	 C ₁₆ H ₂₇ N ₂ O ₅	> 2,50*	—	—
31	 C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₄	> 2,50*	—	—
32	 C ₂₂ H ₃₆ N ₅ O	> 2,50	0,24±0,11	—
33	 C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₄	> 6,00	н.и	0,43±0,14
34	 C ₂₉ H ₃₅ ClN ₂ O ₂ P	1,25±0,15	н.и	0,09±0,03
35	 C ₁₂ H ₂₀ NO ₅	> 2,50*	—	—

Продолжение табл. 1.

Соединение	Химическая формула	Цитотоксичность ($CC_{50} \pm SE$, мМ)	Вirus ингибирующая активность ($EC_{50} \pm SE$, мМ)	
			ВЗН	ВПГ-2
36	 $C_{10}H_{20}N_5O$	$0,63 \pm 0,07$	н.и	$0,26 \pm 0,08$
37	 $C_9H_{17}N_6O$	$2,50 \pm 0,24$	н.и	$0,16 \pm 0,05$
38	 $C_{12}H_{22}N_3O_5$	$2,50 \pm 0,22$	$0,67 \pm 0,14$	$0,81 \pm 0,20$
39	 $C_{16}H_{25}ClN_3O_2$	$0,32 \pm 0,02$	$>0,15$	$>0,15$
Эмбихин	$\times 1/2 ZnCl_2$  $C_5H_{11}Cl_2N$	$0,03 \pm 0,004$	н.и	н.и
Цисплатин	 $Pt(NH_3)_2Cl_2$	$0,10 \pm 0,01$	н.и	н.и
Рибавирин	 $C_8H_{12}N_4O_5$	н.и	$0,10 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,04$

Примечание. > — отсутствие цитотоксического эффекта исследуемых соединений в указанной и меньших концентрациях; >* — возможный цитотоксический эффект исследуемых соединений в точках с максимальными концентрациями перекрывается цитотоксичностью ДМСО, содержащегося в растворах соединений (10 и 5%, соответственно). «—» отсутствие эффекта ингибирования вирусной репликации при концентрациях препарата 5.00 мМ и менее; SE — стандартная ошибка средней величины CC_{50} или EC_{50} ($p < 0,05$); н. и. — не исследовали.

ацилировали хлорацетилхлоридом, а затем полученную хлорацетамидную спиновую метку 44 использовали для алкилирования трифенилфосфина (рис. 1 б). 3,4-Бис-(метоксикарбонил)-2,2,5,5-тетраметилпирролидин-1-оксил (32) получали алкилированием дикарбоновой кислоты 20 диазометаном (рис. 1 в).

Удобным методом введения гидрофильной группы оказалась реакция карбонильных производных, например, 4-оксо-ТЕМПО (2), с аминоксидом. Карбонильное соединение может быть получено *in situ*, например гидролизом имида. Таким образом, из липофильного трет-бутиллина 45 был получен гидрофильный радикал

37. Водорастворимость полученных НР 36 и 37 обеспечивается высокой основностью гуанидинового фрагмента, благодаря которой эти радикалы в нейтральной среде существуют в виде катионов (рис. 1 г). Сложноэфирная группа 4-метоксикарбонил-2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидроимидазол-1-оксила (46) [41] легко реагирует с аминами, в том числе с трис-гидрокси-метиламинометаном (рис. 1 д). Помимо описанного в литературе нитронитроксильного радикала 22 в работе использовали его цинковый комплекс. Любопытно, что комплекс, не содержащий аммиака, образуется при действии аммиачного комплекса хлорида цинка (рис. 1 е).

В набор нитроксильных радикалов 1–39 включены представители различных рядов, существенно различающиеся по своим физическим и химическим свойствам. Так, радикалы пиперидинового ряда (1–3, 9–13, 29, 36) некоторые представители рядов 3-имидазолина (19, 22, 24, 37, 38) и 3-имидазолин-3-оксида 18, а также нитронилнитроксильные радикалы 20 и 21, являются весьма сильными окислителями, а радикалы пирролидинового 4, 5, 14–17, 31 и 35 и имидазолидинового ряда 23, напротив, имеют самые низкие окислительные потенциалы [42]. В состав исследуемой группы соединений вошёл нитроксильный радикал 30,

содержащий объёмные заместители в окружении радикального центра, придающие устойчивость к действию биогенных восстановителей [38]. Следует также отметить, что нитронилнитроксильные радикалы 20 и 21 отличаются способностью селективно реагировать с окисью азота NO, являющейся важным компонентом клеточной сигнальной системы [43]. Можно ожидать, что биологическая активность исследуемых соединений будет зависеть от их распределения в клетках — заряда, способности проникать через клеточные мембраны селективно накапливаться в различных отделах клетки. Поэтому, в набор исследуемых соедине-

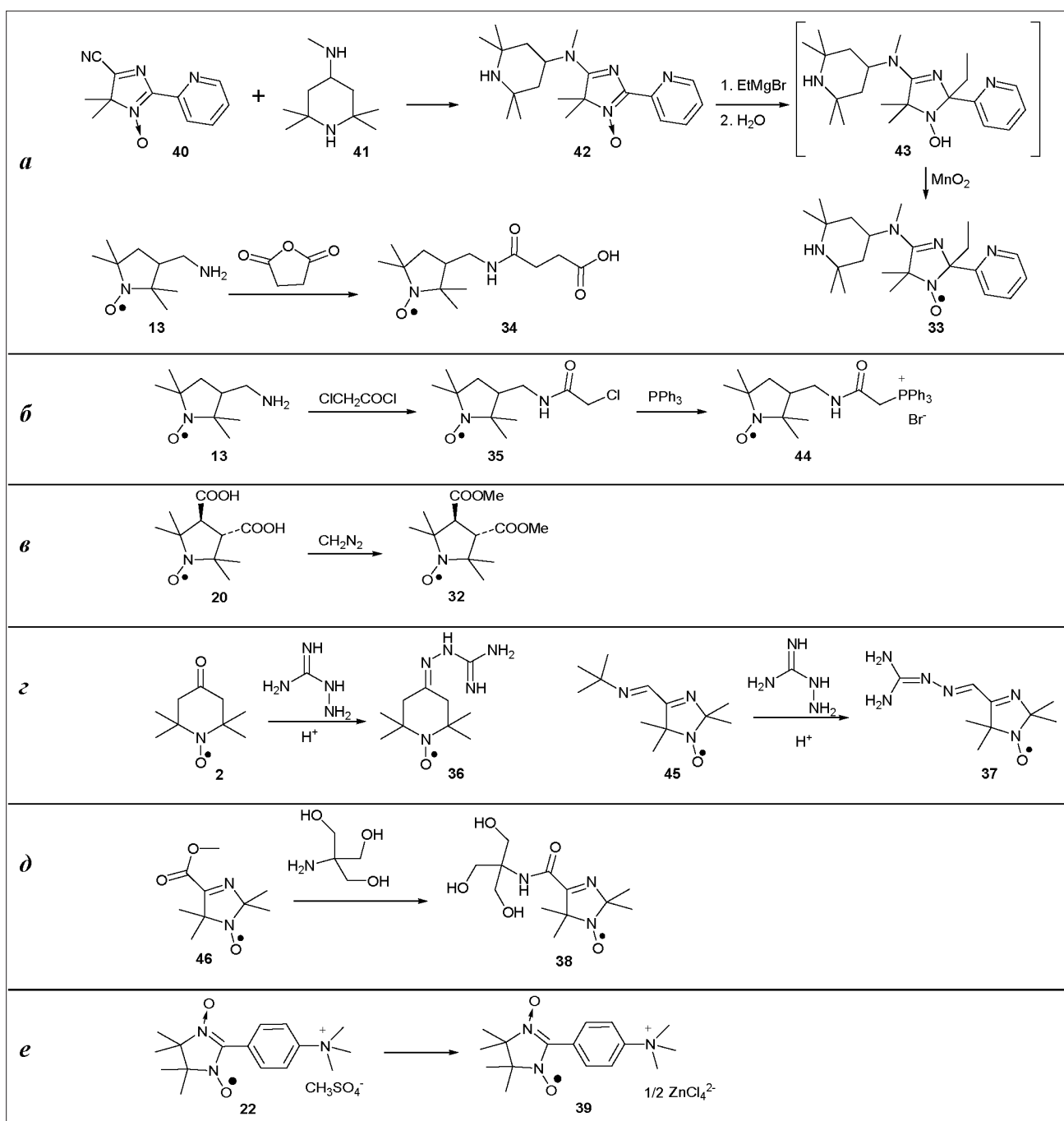


Рис. 1. Принципиальные схемы синтеза нитроксильных радикалов 32–39.

Таблица 2. Определение цитотоксичности исследуемых соединений в отношении опухолевых клеток A431, SW480 и нормальных клеток человека Л68

Наименование препарата	Цитотоксическая концентрация ($CC_{50} \pm SE$, мМ)			Индекс селективности*	
	Клетки A431	Клетки SW480	Клетки Л68	$CC_{50} \text{Л68} / CC_{50} \text{A431}$	$CC_{50} \text{Л68} / CC_{50} \text{SW480}$
1	1,25±0,12	2,50±0,22	2,50±0,30	2,00	1,00
2	0,63±0,05	0,63±0,04	2,50±0,25	3,97	3,97
10	1,25±0,15	1,25±0,20	1,25±0,14	1,00	1,00
12	0,63±0,04	0,63±0,07	2,50±0,17	3,97	3,97
22	0,32±0,02	0,16±0,02	1,25±0,09	3,91	7,81
24	1,25±0,07	1,25±0,09	1,25±0,12	1,00	1,00
25	0,63±0,04	0,63±0,06	0,63±0,04	1,00	1,00
34	1,25±0,12	1,25±0,09	1,25±0,10	1,00	1,00
36	0,63±0,04	0,63±0,04	0,63±0,06	1,00	1,00
39	0,32±0,03	0,32±0,02	1,25±0,17	3,91	3,91
Эмбихин	0,03±0,01	0,12±0,03	0,24±0,02	8,00	2,00

Примечание. * — Индекс селективности (ИС) — отношение CC_{50} исследуемого соединения для клеток нормального фенотипа к CC_{50} для опухолевых клеток.

ний включены и липофильные (8, 19, 30, 35) и гидрофильные производные, в том числе нейтральные (15, 16, 38) катионные (20, 28, 29), анионные (5, 7, 9, 10, 17, 26, 27) и цвиттерион 11. Соединения 13, 14, 22, 24, 32, 36 и 37 способны обратимо протонироваться и при физиологических рН частично или полностью превращаются в катионы. Липофильные катионы 12 и 34 способны селективно накапливаться в митохондриях за счёт трансмембранного потенциала [44]. Предполагалось, что исследование такого широкого набора производных поможет выявить структурные факторы и особенности физических свойств, определяющие биологическую активность нитроксильных радикалов.

Цитотоксическая активность нитроксильных радикалов. Определение цитотоксической активности исследуемых соединений проводили в два этапа. На первом этапе был проведён скрининговый анализ цитотоксичности изучаемых нитроксильных радикалов для опухолевой культуры клеток A431, используемой для исследования активности кандидатных противоопухолевых препаратов [45, 46]. Результаты исследования цитотоксичности 39 нитроксильных радикалов в отношении клеток A431 представлены в табл. 1. CC_{50} удалось определить для 27 соединений. Остальные нитроксильные радикалы не проявили достоверной цитотоксической активности, в том числе при максимальных исследованных концентрациях. Для 4 нерастворимых в воде соединений CC_{50} не были определены вследствие того, что возможный цитотоксический эффект перекрывался цитотоксичностью ДМСО. Максимальной из исследованных соединений цитотоксичностью обладали нитроксильные радикалы 2, 12, 19, 22, 25, 36 и 39, значения их CC_{50} колебались в пределах $3.2\text{--}6.3 \times 10^{-4}$ М. Для 7 соединений CC_{50} равнялась 1.25 мМ, цитотоксические концентрации остальных нитроксильных радикалов находились в интервале от 2.5 до 10 мМ. Рекомендуемая цитотоксичная активность (CC_{50}) для новых химио-

препаратов должна быть не менее 10^{-4} М [47]. Противоопухолевые препараты эмбихин и цисплатин обладали более выраженной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток A431. Так, CC_{50} эмбихина была в 10 раз ниже, чем у наиболее активного нитроксильного радикала 22 (табл. 1).

Наиболее активные нитроксильные радикалы тестировали на культурах клеток A431, SW480 и Л68 (табл. 2.). Нитроксильные радикалы 10, 24, 25, 34 и 36 на культурах клеток ракового и нормального фенотипа показали одинаковый уровень цитотоксичности. Соединения 2, 12, 22 и 39 показали значимый уровень избирательности по отношению к опухолевым клеткам. Индекс селективности (ИС) *in vitro* для исследуемых соединений 2, 12, 22, 39 составлял 3,91—3,97, а препарат 22 имел ИС Л68/SW480, равный 7,81. Данные значения сравнимы с ИС Л68/A431 эмбихина, составляющим 8,00, и превосходят значение ИС Л68/SW480 эмбихина, равное 2,00. Индекс селективности многих противоопухолевых химиопрепаратов обычно составляет 6—8 [48, 49]. Полученные данные удовлетворительно совпадают с описанной ранее цитотоксической активностью нитроксильного радикала TEMPOL в отношении опухолевых клеток человека MCF-7/ADR и клеток нормального фенотипа HBL-100, составляющей 0,41 мМ и 0,94 мМ соответственно (ИС — 2,29) [50].

Было отмечено, что нитроксильные радикалы 10, 24, 25, 34 и 36 в концентрациях 5—10 мМ вызывают лизис клеток A431, SW480 и Л68 непосредственно после добавления, а через 3 ч визуальные цитотоксические проявления отмечаются и при более низких концентрациях. Соединения 2, 12, 22, 39 и эмбихин не вызывают лизиса клеток ни сразу после добавления, ни через 3 ч инкубации даже при концентрации 10 мМ. Литические проявления регистрируются только через 24 ч инкубации; например лизис клеток A431 наблюдается в присутствии радикала 2 в концентрациях 1,25—10 мМ, а через двое суток инкубации и при 0,63 мМ.

Таким образом, среди исследуемых соединений выявлены нитроксильные радикалы, обладающие избирательной цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток. Для проведения дальнейших исследований противоопухолевой активности нитроксильных радикалов *in vivo* наиболее перспективными являются 2, 12, 22 и 39.

Противовирусная активность нитроксильных радикалов. Противовирусная активность описанных выше 39 нитроксильных радикалов в отношении ВЗН и ВПГ-2 представлена в табл. 1. Показано, что 16 и 22 нитроксильный радикал ингибируют репликацию ВЗН и ВПГ-2 соответственно. EC_{50} для этих препаратов варьировали в очень широких пределах от 0,09 до 3,45 мМ. Препараты 2, 6, 8, 15, 16, 20, 21 и 38 обладали антивирусной активностью в отношении двух вирусов. Для 12 соединений не было выявлено достоверной антивирусной активности. Некоторые нитроксильные радикалы обладали антивирусной и цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток. В ряде случаев противовирусная активность проявлялась в концентрациях, близких к цитотоксичным. Значения противовирусной активности вполне сравнимы с активностью рибавирина (табл. 1) и хорошо согласуется с опубликованными данными для рибавирина по отношению к ВЗН [51]. Однако, например, при их использовании для наружной терапии герпетических поражений можно существенно увеличить концентрацию антивирусного средства в составе препарата и избежать его возможной токсичности при парентеральном введении. Так, ацикловир для наружного применения имеет концентрацию активного компонента до 50 мг/мл.

Об антивирусной активности нитроксильных радикалов известно весьма мало. Так, ранее было установлено, что нитроксильный радикал 4-maleimido-ТЕМРО способен ингибировать инфекционность вируса простого герпеса первого типа [52]. Исследование противовирусной активности нитроксильно-радикальных производных азидотимицина (АЗТ) показало, что по сравне-

нию с АЗТ нитроксильные производные обладают меньшей активностью по отношению к вирусу иммунодефицита человека первого типа, но в отличие от АЗТ, который имеет низкую активность против цитомегаловируса и вируса везикулярного стоматита, его нитроксильные производные достаточно эффективно ингибируют репродукцию этих вирусов [53].

Имеющиеся данные не позволяют высказать значимую гипотезу о механизме антивирусного действия нитроксильных радикалов. Недавно было показано, что ариловые производные роданина обладают выраженной активностью против широкого спектра оболочечных вирусов, как РНК-содержащих (включая ВЗН), так и ДНК-содержащих. Эти соединения связываются с вирусными липидными мембранами, тем самым препятствуя их слиянию с клеточными мембранами и проникновению генетического материала оболочечных вирусов внутрь клетки [54]. Возможно, противовирусная активность исследуемых нитроксильных радикалов обусловлена похожим механизмом. Другая возможность связана с их цитотоксической активностью. Вполне возможно, что репликация вирусов в этих условиях также ингибируется.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований противоопухолевой и антивирусной активности нитроксильных радикалов *in vivo*. Некоторые исследованные нитроксильные радикалы обладают выраженной опухолево-специфичной цитотоксичностью и противовирусной активностью одновременно. Данные свойства делают их весьма перспективными для дальнейших исследований их активности в отношении вирусиндуцированных опухолей и онкологических заболеваний, осложнённых вирусными инфекциями.

Данное исследование было поддержано грантом Х.Д. № 16/09-РД-М, грантами Президента Российской Федерации НШ-387.2008.4 и НШ-65387.2010.4 и грантом Минобрнауки № 11.G34.31.0034.

ЛИТЕРАТУРА

1. McConnell H. M. Spin labeling: theory and applications / Berliner L., ed. New York: Academic Press; 1976.
2. Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K.-I. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. Free Radic Biol Med 2007; 42: 1632—1650.
3. Kuppusamy P., Afeworki M., Shankar R., et al. *In vivo* electron paramagnetic resonance imaging of tumor heterogeneity oxygenation in a murine model. Cancer Res 1998; 58: 1562—1568.
4. Matsumoto K., Hyodo F., Matsumoto A. et al. High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. Clin Cancer Res 2006; 12: 2455—2462.
5. Wang Y., Larrick J. W. Antioxidant nitroxides and nitrones as therapeutic agents. U. S. Patent 2004; No: US 6,717,012.
6. Beckman K., Ames B. Oxidative decay of DNA. J Biol Chem 1997; 272: 19633—19636.
7. Zhao Q., Fujiwara, Kondo T. Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia. Free Rad. Med. 2006; 40: 1131—1143.
8. Sui S., Mitchel J., Samuni A. et al. Nitroxide Tempo, a small molecule, induces apoptosis in prostate carcinoma cells and suppresses tumor growth in athymic mice. Cancer 2005; 103: 1302—1313.
9. Krishna M., Samuni A., DeGraff W. et al. Potential use of nitroxides in radiation oncology. Cancer Res 1992; 52: 1750—1753.
10. Selvendiran K., Ahmed S., Dayton A. et al. Safe and targeted anticancer efficacy of a novel class of antioxidant-conjugated difluorodienyl piperidones: Differential cytotoxicity in healthy and cancer cells. Free Rad Biol Med 2010; 48: 1228—1235.
11. Zhang J., Zhang Z., Hui L. et al. Novel semisynthetic spin-labeled derivatives of podophyllotoxin with cytotoxic and antioxidative activity. Bioorg Med Chem Let 2010; 20: 983—986.
12. Jin Y., Chen S., Tian X. Synthesis and biological evaluation of new spin-labeled derivatives of podophyllotoxin. Bioorg Med Chem 2006; 14: 3062—3068.
13. Gadjeva V. G. Two spin labeled triazenes: relationship between biochemical and biological activities. Int J Pharm 2002; 247: 39—45.
14. Zheleva A. M., Gadjeva V. G. Spin labelled nitrosoureas and triazenes and their non-labelled clinically used analogues — a comparative study

- on their physicochemical properties and antimelanomic effects. *Int J Pharm* 2001; 212: 257—266.
15. *Sosnovsky G., Bell P.* In the search for new anticancer drugs. 29. A study on the correlation of lipophilicities, ionization constants and anticancer activities of aminoxyl labeled tepa congeners. *Life Sciences* 1998; 62: 639—648.
 16. *Sosnovsky G., Li S. W.* In the search for new anticancer drugs XII. Synthesis and biological evaluation of spin labeled nitrosoureas. *Life Sciences* 1985; 36: 1479—1483.
 17. *Kaledin V. I., Popova N. A., Nikolin V. P. et al.* Tempol reduces the therapeutic effect of cyclophosphamide on an experimental tumour model. *Free Rad Res* 2009; 43: 685—690.
 18. *Розанцев Э. Г.* Свободные иминоксильные радикалы, Химия. М.: 1970.
 19. *Мишарин А. Ю., Поляновский О. Л.* Синтез и применение спин-меток 2,2,6,6-тетраметил-1-оксилпиперидин-4-малеинимида и 2,2,6,6-тетраметил-1-оксилпиперидин-4-изомалеинимида. *Изв. АН СССР. Сер хим* 1974; 11: 2526—2529.
 20. *Rassat A., Rey P.* Nitroxides 23. Preparation of amino acid free radicals and their complex salts. *Bull Soc Chim Fr* 1967; 815—817.
 21. *Nakatsuji S., Takai A., Nishikawa K. et al.* Magnetic properties of charge-transfer complexes based on TEMPO radicals. *Chem Commun* 1997; 3: 275—276.
 22. *Hankowsky H. O., Hideg K., Lex L.* Nitroxyls. 8. Synthesis of nitroxylphosphinimines — a convenient route to amine, isothiocyanate, aminocarbonylaziridine, and carbodiimide nitroxyls. *Synthesis* 1981; 2: 147—149.
 23. *Hideg K., Hankovszky H. O., Lex L., Kucsár G.* Nitroxyls. 6. Synthesis and reactions of 3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydropyrrole-1-oxyl and 3-formyl derivatives. *Synthesis* 1980; 11: 911—914.
 24. *Sosnovsky G., Cai Z. W.* A study of the favorskii rearrangement with 3-bromo-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl. *J Org Chem* 1995; 60: 3414—3418.
 25. *Miyake M., Shen J., Liu Sh. et al.* Acetoxymethoxycarbonyl nitroxides as electron paramagnetic resonance proimaging agents to measure O-2 levels in mouse brain: A pharmacokinetic and pharmacodynamic study. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 1187—1193.
 26. *Войнов М. В., Володарский Л. Б.* *Изв АН Сер хим* 1997; 1: 131—136.
 27. *Woldman Ya. Yu., Khrantsov V. V., Grigor'ev I. A. et al.* Spin-trapping of nitric-oxide by nitronyl nitroxides - measurement of the activity of no synthase from rat cerebellum. *Biochem Biophys Res Com* 1994; 202: 195—203.
 28. *Григорьев И. А., Кирилук И. А., Стариченко В. Ф., Володарский Л. Б.* Получение стабильных нитроксильных радикалов с аминогруппой у а-углеродного атома радикального центра при окислительном аминировании N,N-диоксидов и N-оксидов 4Н-имидазола. *Известия АН СССР Сер хим* 1989; 3: 661—667.
 29. *Berezina T. A., Reznikov V. A., Volodarsky L. B.* Synthesis and some properties of heterocyclic amidine derivatives of 3-imidazoline nitroxides. *Tetrahedron* 1993; 49: 10693—10704.
 30. *Володарский Л. Б., Резников В. Д., Кобрин В. С.* Получение и свойства имидазолиновых солей, содержащих нитроксильный радикальный центр. *Ж орган химии* 1979; 15: 2: 415—422.
 31. *Шукин Г. И., Володарский Л. Б.* Взаимодействие амидов производных 3-имидазолина и 3-имидазолин-3-оксида с гипобромитом натрия. *Изв АН СССР Сер хим* 1979; 28: 228—231.
 32. *Kirilyuk I., Polovyanenko D., Semenov S. et al.* Inclusion complexes of nitroxides of pyrrolidine and imidazoline series with cucurbit[7]uril. *J Phys Chem.* 2010; 114: 1719—1728.
 33. *Яньшол В. В., Кирилук И. А., Григорьев И. А. и др.* Изучение антиоксидантных свойств нитроксильных радикалов и гидроксиламинов при взаимодействии с триплетным и дезаминированным кинуренином. *Изв АН Сер хим* 2010; 1: 67—75.
 34. *Niks M., Otto M.* Towards an optimized MTT assay. *J Immunol Meth* 1990; 130: 1: 149—151.
 35. *Леннет Э., Шмидт Н.* Лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний. М.: 1974; 44—95.
 36. *Razumov I. A., Kazachinskaja E. I., Ternovoi V. A. et al.* Neutralizing monoclonal antibodies against Russian strain of the West Nile virus. *Viral Immunol* 2005; 18: 558—568.
 37. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* М.: 2000; 1—398.
 38. *Kirilyuk I. A., Shevelev T. G., Morozov D. A. et al.* Grignard reagent addition to 5-alkylamino-4H-imidazole 3-oxides: Synthesis of new pH-sensitive spin probes. *Synthesis* 2003; 6: 871—878.
 39. *Couet W. R., Brasch R. C., Sosnovsky G. et al.* Influence of chemical-structure of nitroxyl spin labels on their reduction by ascorbic-acid. *Tetrahedron* 1985; 41: 1165—1172.
 40. *Кирилук И. А., Каледин В. И., Попова Н. А. и др.* Нитроксильный антиоксидант ТРРА-ТЕМПО повышает эффективность противоопухолевой терапии на модели перевиваемой лимфосаркомы мышей. *Бюлл Эксп Биол Мед* 2010; 148: 7: 85—89.
 41. *Шукин Г. И., Григорьев И. А., Володарский Л. Б.* β-дикарбоновые производные стабильных нитроксильных радикалов 3-имидазола. *Изв СО АН СССР Сер хим* 1977; 9: 4: 135—140.
 42. *Володарский Л. Б., Григорьев И. А., Диканов С. А. и др.* Имидазолиновые нитроксильные радикалы, Глава 5. Окислительно-восстановительные реакции нитроксильных радикалов. Новосибирск: Наука Сиб. Отд-е, 1988; 171—216.
 43. *Khrantsov V., Woldman Ya., Grigor'ev I. et al.* Trapping of nitric oxide and nitric oxide synthase activity measurement by nitronyl nitroxyl radicals. *Magnetic Res Med* 1995; 6: 285—287.
 44. *Murphy M. P., Smith R. A. J.* Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 629—656.
 45. *Benedetto M. Di., Starzec A., Vassy R. et al.* Inhibition of epidermoid carcinoma A431 cell growth and angiogenesis in nude mice by early and late treatment with a novel dextran derivative. *Br J Cancer* 2003; 88: 1987—1994.
 46. *Heise C., Sampson-Johannes A., Williams A. et al.* ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Medicine* 1997; 3: 6: 639—644.
 47. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев, ред.* М.: 2000.
 48. *Maher B. A.* Researchers are building a viral arsenal to fight cancer. *The Scientist* 2001; 15: 16: 24.
 49. *Ring C. J.* Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J Gen Virol* 2002; 83: 491—502.
 50. *Gariboldi M. B., Lucchi S., Caserini C. et al.* Antiproliferative effect of the piperidine nitroxide TEMPOL on neoplastic and nonneoplastic mammalian cell lines. *Free Rad Biol Med* 1998; 24: 913—923.
 51. *Daya C. W., Smeeta D. F., Julandera J. G. et al.* Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res* 2005; 67: 1: 38—45.
 52. *Горбунов Н. В., Насыров Р. В., Ерин А. Н. и др.* Эффект нитроксильных радикалов на патогенные свойства герпесвирусов (спиновая метка в исследовании взаимодействия вируса и макрофагов) *Бюлл Эксп Биол Мед* 1992; 113: 6: 604—606.
 53. *Сень В. Д., Голубев В. А., Рукина Н. А. и др.* Нитроксильные производные 3'-азидо-2'-дидеокситимидина, обладающие антивирусной активностью. Патент РФ 2004. № 2103274. БИ: 32/2004
 54. *Wolf M. C., Freiberg A. N., Zhang T. et al.* A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 7: 3157—3162.

Научные подходы к разработке комбинированной лекарственной формы на основе биотехнологической субстанции

Р. А. АБРАМОВИЧ¹, В. А. БЫКОВ, И. А. ЕЛАГИНА², Н. А. ПАПАЗОВА², А. Н. ВОРОБЬЕВ¹

¹ Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр) Российского университета дружбы народов, Москва

² Кафедра фармацевтической технологии факультета повышения квалификации медицинских работников Российского университета дружбы народов, Москва

Scientific Approaches to Development of Medicinal Formulation Based on Biotechnological Substance

R. A. ABRAMOVICH, V. A. BYKOV, I. A. ELAGINA, N. A. PAPAZONA, A. N. VOROBIEV

Russian University of People's Friendship, Moscow

В проведённом исследовании показана возможность создания композиции, содержащей рекомбинантный человеческий альфа-2 интерферон и экстракт алоэ сухой в форме суппозитория. Определены технологические подходы к разработке предложенного лекарственного средства. Доказано отсутствие взаимодействия между активными и вспомогательными компонентами методом спектроскопии ЯМР ¹H твердого тела. Проведено исследование специфической активности полученного лекарственного средства.

Ключевые слова: рекомбинантный человеческий альфа-2 интерферон, экстракт алоэ сухой, суппозитории, ЯМР-спектроскопия.

The study demonstrated possible design of a medicinal formulation in the form of suppositories comprising human recombinant interferon- $\alpha 2$ and dry aloe extract. The approaches to the development of the suppositories were technology — derived. No interaction between the active and auxiliary components was proved by solid state ¹H-NMR spectroscopy. The specific activity of the drug was investigated.

Key words: human recombinant interferon- $\alpha 2$, aloe extract, suppositories, ¹H-NMR spectroscopy.

Иммунобиологические препараты становятся всё более востребованными в противомикробной и противовирусной терапии. Применение комплексной терапии, включающей также растительный компонент, стимулирующий собственный иммунитет человека, является перспективным [1, 2]. Препараты, содержащие интерферон альфа-2b, в форме суппозитория получили широкое применение в медицинской практике благодаря удобству такого способа применения, а также безопасности и эффективности [3, 4].

Цель настоящего исследования — создание комбинированного лекарственного средства на основе интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного и алоэ экстракта сухого. Интерферон альфа-2b успешно используется в противовирусной терапии, а экстракт алоэ воздействует на иммунную систему человека, активи-

руя макрофаги, вызывает высвобождение интерферонов и интерлейкинов. В качестве вспомогательного вещества, способного усилить фармакологический эффект использовали тизоль — аквакомплекс титана глицеросольвата. При разработке лекарственных препаратов на основе тизоля показана возможность сочетания его с лекарственными веществами разной химической природы с получением устойчивых при хранении лекарственных форм, а также со способностью тизоля оказывать иммуностимулирующее действие [5].

Материал и методы

Фракционный состав субстанции алоэ экстракта сухого определяли при помощи аналитической просеивающей машины с набором сит Retsch AS 200. Микроскопические исследования проводились на электронном растровом микроскопе Jeol «JSM-6490LV».

Для регистрации спектров ЯМР ¹H твердого тела использовали ЯМР-спектрометр VARIAN 500 MHz.

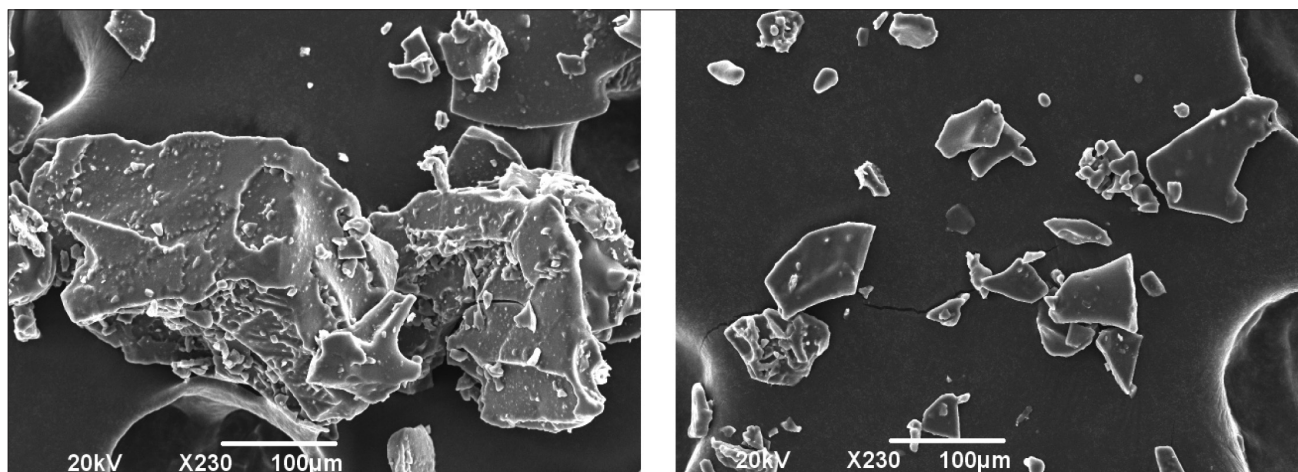
Определение специфической активности проводили согласно методам контроля иммуномодуляторов по нормативным документам: МУК 4.1/1.2588-96 «Методы контроля ме-

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции:

Таблица 1. Фракционный состав субстанции алоэ экстракта сухого

Размер частиц, мкм	Содержание, %
> 250	26,15
125—250	27,27
< 125	43,89

**Рис. 1. Сравнительные размеры частиц.**

а — порошок субстанции алоэ экстракта сухого до измельчения; б — порошок субстанции алоэ экстракта сухого после измельчения.

дицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» и ФС 42-3874-99.

Результаты и обсуждение

Важным этапом при создании любой лекарственной формы является рассмотрение фармацевтических факторов, способных в конечном счёте, оказать влияние на биодоступность и эффективность препарата. Поэтому способ введения субстанций и выбор суппозиторной основы представляют важный этап разработки лекарственного средства. Субстанции возможно вводить в основу по типу суспензии или в виде раствора. Интерферон альфа-2b возможно вводить только в виде раствора, из-за высокой активности субстанции. Введение экстракта алоэ сухого предпочтительнее по типу суспензии, в связи тем что лекарственное растительное сырьё является средой для размножения микроорганизмов.

При введении активных субстанций в суппозитории по типу суспензии важным фармацевтическим фактором является размер вводимых частиц, так как биодоступность лекарственного средства зависит от седиментации взвешенных частиц при взаимодействии между расплавленной липофильной основой свечей и гидрофильной слизистой прямой кишки. Частицы препарата, хорошо растворимого в воде, могут проникнуть через этот слой гораздо быстрее, если они имеют большой размер от 125 до 250 мкм. Если частицы слишком велики (более 250 мкм) то это приведёт к технологическим проблемам — к не соблюдению

однородности дозирования. В то же время мелкие частицы не могут проникнуть через поверхность и будут оставаться в расплавленной массе свечи. Кроме того, мелкие частицы в высоких концентрациях могут привести к нежелательным явлениям в связи с увеличением вязкости расплавленной массы [6].

Использованная при разработке субстанция алоэ экстракта сухого имела достаточно большой процент крупной фракции (> 250 мкм) и требовала измельчения (табл. 1).

На рис. 1 представлены сравнительные размеры частиц субстанций до и после измельчения и просеивания.

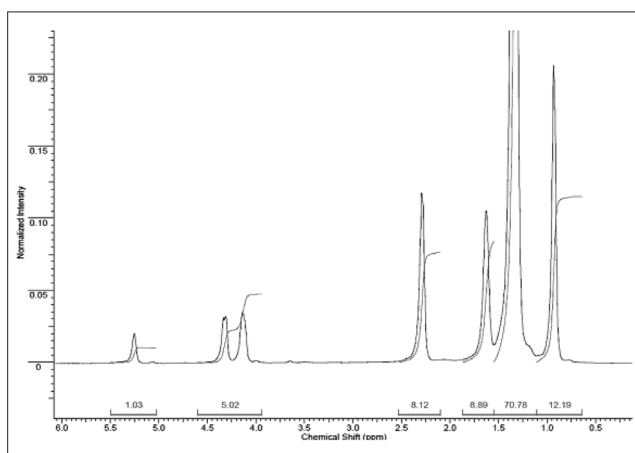
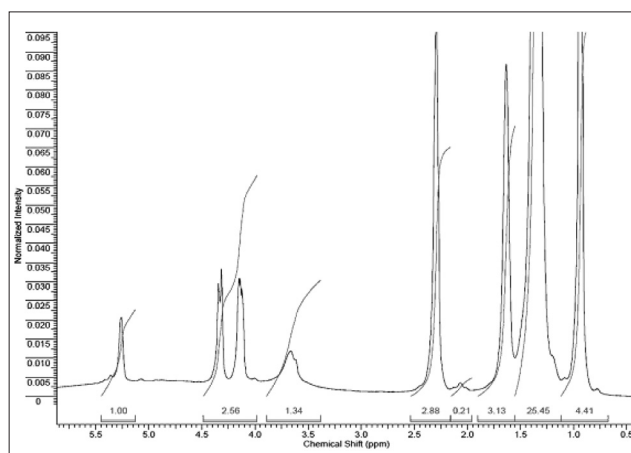
Для суппозиторий, имеющих сложный комбинированный состав, необходимо подобрать подходящую основу, позволяющую сохранить стабильность всех компонентов в процессе хранения.

При подборе основы были использованы твердый жир (hard fat), Витепсол Н 15, S 51, S 55, S 58. В табл. 2 представлены характеристики марок твердого жира, использованных в настоящем исследовании при разработке суппозиторий комбинированного состава.

Применение основы Витепсол Н 15 и твердый жир производства Lodders Crokiaan (Голландия) показало схожие результаты. При их использовании для получения суппозиторий комплексного состава необходимо дополнительное введение эмульгатора. Основы Витепсол S 51 и S 55, S58, содержащие эмульгатор в качестве дополнитель-

Таблица 2. Марки основ, использованных при разработке суппозитория

Основа	Состав
Твердый жир (Loders Croklaan, Голландия) (ТУ 9369-001-28910991-10, Ph.Eur., USP/NF)	Гидрогенизированные пальмоядровые глицериды
Витепсол Н 15 (произв. Sasol, Германия, Ph.Eur., USP/NF)	Гидрогенизированные пальмоядровые глицериды + Гидрогенизированные пальмоядровые глицериды + цетеарет-25 + глицерилрицеинолеат
Витепсол S 51 (произв. Sasol, Германия, Ph.Eur., USP/NF)	Гидрогенизированные пальмоядровые глицериды + цетеарет-25 + пчелиный воск
Витепсол S 55 (произв. Sasol, Германия, Ph.Eur., USP/NF)	Гидрогенизированные пальмоядровые глицериды + цетеарет-25 + глицерилрицеинолеат
Витепсол S 58 (произв. Sasol, Германия, Ph.Eur., USP/NF)	Гидрогенизированные пальмоядровые глицериды + цетеарет-25 + глицерилрицеинолеат

**Рис. 2. Спектр ЯМР ^1H твердого жира (Loders Croklaan, Голландия).****Рис. 3. Спектр ЯМР ^1H суппозитория комбинированного состава.**

ного компонента, образуют однородную массу и равномерные суппозитории, однако данные основы являются достаточно дорогостоящими.

Наиболее приемлемой основой по технологии и по ценовым показателям является твердый жир марки «Hard fat» (Loders Croklaan, Голландия), который имеет температуру плавления 34–37,5°C. Это позволяет вводить термолабильные компоненты в широком диапазоне температур от 34–39°C, что значительно снижает риски денатурации.

Отсутствие взаимодействия активных компонентов с указанной основой и между собой было доказано методом спектроскопии ЯМР ^1H твердого тела. Для проведения исследования были приготовлены суппозитории массой 1,5 г на основе твердого жира (произв. Loders Croklaan, Голландия) с добавлением лецитина как эмульгатора. Полученный спектр ЯМР ^1H суппозитория комбинированного состава сравнивали со спектром твердого жира марки «Hard fat» (Loders Croklaan, Голландия). Результаты представлены на рис. 2, 3.

Отличие спектра ЯМР ^1H твердого жира от спектра суппозитория состоит в наличии в последнем дополнительных сигналов в области 2,1 и 3,5–3,9 м. д. Первый из них обусловлен компонентами вспомогательных веществ (экстракт алоэ, α -токоферол, тизоль, лецитин). Более ин-

тенсивный сигнал, близкий по площади сигналу метинового протона триглицерида, обусловлен протонами метинных и метиленовых групп фрагментов ОСН и лецитина. Сигналы, соответствующие ОН-группам, распределены в области от 3,2 до 5,7 м. д. и имеют площадь в 2–3 раза большую, чем сигнал вышеупомянутого метинового протона триглицерида. Таким образом, учитывая неизменность химических сдвигов протонов триглицеридов, спектры ЯМР ^1H исследуемых суппозитория могут быть интерпретированы как суперпозиция протонных спектров отдельных компонентов.

Наблюдаемое отсутствие смещений сигналов протонов компонентов в спектрах суппозитория можно считать доказательством отсутствия взаимодействия между всеми активными и вспомогательными компонентами готовой лекарственной формы.

Суппозитории комбинированного состава были проверены на противовирусную активность в сравнении с суппозиториями, содержащими в качестве активных субстанции только интерферон альфа 2b.

Результаты определения противовирусной активности приведены в табл. 3.

Результаты определения противовирусной активности суппозитория комбинированного

Таблица 3. Противовирусная активность препаратов в одном суппозитории

Состав, г	Активность
Интерферон альфа-2b, вода, натрия хлорид, натрия гидрофосфата додекагидрат, натрия дигидрофосфата дигидрат, лецитин, твердый жир (произв. Loders Croklaan, Голландия) до массы суппозитория 1,5 г	606 000
Интерферон альфа-2b, вода, натрия хлорид, натрия гидрофосфата додекагидрат, натрия дигидрофосфата дигидрат, алоэ экстракт сухой, тизоль, лецитин, α -токоферол, твердый жир (произв. Loders Croklaan, Голландия) до массы суппозитория 1,5 г	849 333

состава, содержащие интерферон альфа-2b, экстракт алоэ сухой, тизоль, лецитин и α -токоферол показали, что противовирусная активность образца разработанных суппозиториях почти на 40% превышает противовирусную активность образца, содержащего только интерферон альфа-2b.

Заключение

В проведенном исследовании показана возможность создания композиции, содержащей рекомбинантный человеческий альфа-2b интерферон и экстракт алоэ сухой в форме суппозиториях. Определены технологические подходы к разработ-

ке предложенного лекарственного средства. Доказано отсутствие взаимодействия между активными и вспомогательными компонентами методом спектроскопии ЯМР ^1H твердого тела. Проведено сравнительное исследование специфической активности полученного лекарственного средства и показано увеличение противовирусной активности разработанного состава.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП РУДН при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках госконтракта № 16.552.12.7002. по мероприятию 5.2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Перчаткин С. В. Эффективность эраконда и экстракта алоэ в повышении иммунного статуса животных: дис. канд. вет. наук: 16.00.04. Троицк, 2002; 148.
2. Завьялова И. Т. Разработка технологии таблеток, содержащих экстракты алоэ древовидного. Дисс. канд. фармацевт. наук: 15.00.01. СПб., 1993; 47.
3. Каграманова Ж. А., Малиновская В. В., Парфенов В. В. Терапия рецидивирующей герпес-вирусной инфекции у женщин препаратом «Виферон-3». Росс журн кож вен забол (Приложение «Герпес») 2008; 1: 44–46.
4. Еришов Ф. И., Смирнова Т. Д., Оспельникова Т. П., Кудряшов И. П. Интерфероны и другие цитокины при хроническом пиелонефрите. Вест Росс Акад мед наук. 2010; 9: 18–23.
5. Смагина Т. А., Бекетов Б. Н. Перспективы использования в медицине аквакомплекса глицеросольвата титана и препаратов на его основе. Бюллетень сибирской медицины Приложение 2, Тюмень, 2006; 131–132.
6. Muller, B. W. Suppositories, pharmakologic, biopharmazie and galen rectal and vaginal anzuwendender Arzneiformen Wissenschaftl. Verlag, Stuttgart, Germany. 1986; 371.

Изучение эффективности ремаксола в условиях комплексной терапии экспериментального генерализованного туберкулёза у мышей

Д. С. СУХАНОВ¹, Т. И. ВИНОГРАДОВА², А. В. ЕЛЬКИН², Н. В. ЗАБОЛОТНЫХ²,
С. Н. ВАСИЛЬЕВА², М. Л. ВИТОВСКАЯ²

¹ Северо-западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург

Investigation of Remaxol Efficacy in Complex Therapy of Experimental Generalized Tuberculosis on Mice

D. S. SUKHANOV, T. I. VINOGRADOVA, A. V. ELKIN, N. V. ZABOLOTNYKH, S. N. VASILYEVA, M. L. VITOVSKAYA

I. I. Mechnikov North West State Medical University, St. Petersburg

St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg

Представлены результаты экспериментального изучения эффективности ремаксола в составе комплексной химиотерапии генерализованного лекарственно-устойчивого туберкулёза. Для моделирования туберкулёза использовали изолят *Mycobacterium tuberculosis* 5419 СПбНИИФ (выделен от больного с впервые выявленным туберкулёзом лёгких), устойчивый к изониазиду (10 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (10 мкг/мл) и этионамиду (30 мкг/мл). Базовая полихимиотерапия включала четыре противотуберкулёзных препарата в высших терапевтических дозах — изониазид, амикацин, этамбутол и таваник, курс лечения составил 8 недель. Ремаксол назначался в дозе 25 мл/кг, внутривентриально, 5 раз в неделю, 14 инъекций. Установлено существенное активирующее влияние ремаксола на напряжённость местного иммунитета лёгочной ткани: по изменению клеточного состава гранулём (с преимущественно эпителиоидного на преимущественно лимфоидный) и по более частому обнаружению крупных лимфогистиоцитарных инфильтратов. Назначение ремаксола также значительно повысило поглотительную и переваривающую активность фагоцитоза перитонеальных макрофагов, ингибированного в ходе развития экспериментальной туберкулёзной инфекции.

Ключевые слова: экспериментальный туберкулёз, лекарственная устойчивость, химиотерапия, ремаксол.

Efficacy of remaxol in complex chemotherapy of generalized drug resistant tuberculosis was studied on mice. *Mycobacterium tuberculosis* 5419 SPBNIIF isolated from a patient with freshly diagnosed pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid (10 mcg/ml), rifampicin (40 mcg/ml), streptomycin (10 mcg/ml) and ethionamide (30 mcg/ml) was used in the experiments. The main polychemotherapy included 4 antituberculosis drugs in the highest therapeutic doses: isoniazid, amikacin, ethambutol and tavanic, the treatment course was 8 weeks. Remaxol was administered in a dose of 25 ml/kg intraperitoneally 5 times a week (14 injections). Significant activating effect of remaxol on the tension of the lung tissue local immunity was revealed by changes in the granuloma cell composition (from mainly epithelioid to mainly lymphoid) and by more frequent large lymphohistiocytic infiltrates. The use of remaxol also greatly increased the absorptive and digestive activity of the peritoneal macrophages phagocytosis, inhibited in the process of the experimental tuberculosis development.

Key words: experimental tuberculosis, drug resistance, chemotherapy, remaxol.

Введение

Низкая эффективность лечения туберкулёза лёгких с лекарственной устойчивостью микобактерий вызывает необходимость поиска новых методов и средств терапии [1]. Помимо разработки и оценки эффективности новых этиотропных химиопрепаратов, большое значение имеет совер-

шенствование патогенетических методов лечения. Комбинированная химиотерапия не повышает эффективность фагоцитарной реакции, поскольку неизбежно вызывает дополнительные нарушения в клеточном метаболизме, отрицательно влияя на функциональную активность клеток [2]. В этих условиях особое значение имеет использование фармакологических средств, повышающих эффективность фагоцитоза и способствующих элиминации возбудителя, усиливая устойчивость клеток макроорганизма к повреждающим воздействиям [3].

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47. СЗГМУ им. И. И. Мечникова

Одним из перспективных метаболических корректоров является оригинальный сукцинат-содержащий препарат «Ремаксол» (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»), содержащий в своём составе активные компоненты — янтарную кислоту, рибоксин, никотинамид, метионин, а также электролиты — натрия хлорид, магния хлорид, калия хлорид и сольстабилизирующий агент N-метилглюкамин. Активность компонентов, входящих в представляемую композицию, при поражениях печени различного генеза доказана в экспериментальных и клинических исследованиях [4, 5]. Вместе с тем данные о влиянии применения ремаксолола на течение туберкулёзного процесса в настоящее время отсутствуют.

Цель настоящего исследования — изучение эффектов включения в комплексную терапию экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулёза гепатопротектора с антигипоксантами активностью Ремаксолола.

Материал и методы

Эксперимент проведён на 63 белых нелинейных мышах самца с исходной массой тела 14—16 г.

Для моделирования туберкулёза использовали клинический изолят *Mycobacterium tuberculosis* 5419 СПБНИИФ, устойчивый к изониазиду (МПК 10 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (10 мкг/мл), этионамиду (30 мкг/мл), выделенный от больного с впервые выявленным туберкулёзом лёгких.

Микобактериальную суспензию для заражения мышей готовили *ex tempore* из 3-недельных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* второй генерации, культивируемых на среде Левенштейна—Йенсена. Заражающая доза — 1×10^7 КОЕ в 0,2 мл физиологического раствора натрия хлорида. Суспензию микобактерий туберкулёза (МБТ) вводили мышам в латеральную хвостовую вену (0,2 мл).

Мониторинг развития туберкулёзного процесса осуществляли, начиная с 8-го дня после заражения, путём визуального осмотра лёгких при вскрытии 2—3 мышей. На 17-й день после инфицирования, когда в лёгких отчётливо визуализировались множественные субмилиарные ($d < 1$ мм) и единичные милиарные ($d > 1$ мм) очаги специфического воспаления, все мыши ($n=63$) были распределены на следующие группы:

- интактные мыши (незаражённые, нелеченные) — 15;
- заражённые мыши без лечения (контроль заражения) — 16;
- заражённые мыши, получавшие полихимиотерапию: изониазид (25 мг/кг, подкожно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + этамбутол (50 мг/кг, внутривенно) + таваник (20 мг/кг, внутривенно) — контроль полихимиотерапии — 16;
- заражённые мыши, получавшие ремаксол (25 мг/кг, внутривенно, 14 введений, 5 инъекций в неделю) + изониазид (25 мг/кг, подкожно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + этамбутол (50 мг/кг, внутривенно) + таваник (20 мг/кг, внутривенно) — 16.

Лечение во всех подопытных группах начинали на фоне распространённого специфического поражения лёгких при регистрации в лёгких множественных субмилиарных (< 1 мм) либо единичных милиарных очагов — с 17-го дня после заражения, курс лечения — 8 недель. Базовая химиотерапия составлена из четырех противотуберкулёзных препаратов в высших терапевтических дозах — изониазид (Н), амикацин (А), этамбутол (Е) и таваник (Т) — с учётом спектра лекарственной

чувствительности штамма МБТ, а также с учётом стандартов, представленных в приложении № 6 к приказу Минздрава России № 109 от 21.03.2003 «Инструкция по химиотерапии больных туберкулёзом». Этот режим химиотерапии отработан в наших предшествующих экспериментах и показал оптимальные результаты лечения экспериментального генерализованного туберкулёза, вызванного клиническим изолятом *Mycobacterium tuberculosis* 5419 СПБНИИФ [6].

Группами сравнения служили заражённые нелеченные мыши (контроль заражения), а также животные, получавшие только противотуберкулёзные препараты (ПТП) весь период наблюдения (контроль химиотерапии).

В ходе исследования регистрировали общеповеденческие реакции мышей, потребление ими кормов и воды. Ежедневно осуществляли мониторинг динамики массы тела животных, для взвешивания использовали электронные весы модели AdventurerTM, точность взвешивания $\pm 0,1$ г.

Летальность животных вычисляли по формуле:

$$\text{Летальность} = \frac{\text{число погибших животных}}{\text{число заражённых животных}} \times 100$$

Индекс поражения лёгких устанавливали по совокупности экссудативных и продуктивных изменений в условных единицах — баллах [7].

Экссудативные изменения:

- лёгкие воздушны — 0;
- единичные безвоздушные очаги — 0,25;
- лёгкие безвоздушны на 1/2 — 0,5;
- лёгкие безвоздушны на 2/3 — 0,75;
- лёгкие безвоздушны на всём протяжении — 1,0;

Продуктивные очаги:

- единичные субмилиарные очаги — 0,5;
- многочисленные (не более 20) — 1,0;
- многочисленные субмилиарные (более 20) — 1,5;
- единичные милиарные — 1,75;
- многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные — 2,0;
- многочисленные милиарные (не более 10) — 2,25;
- многочисленные милиарные, сливающиеся — 2,75;
- появление мелких казеозных некротических фокусов — 3,0;
- обширный казеоз — 4,0;
- сплошное поражение лёгких — 5,0.

Биометрические показатели. Коэффициенты массы (КМ) лёгких и селезёнки определяли по формуле:

$$\text{КМ} = \frac{(\text{масса органа, г}) \times 100}{\text{масса тела животного, г}}$$

Бактериологические показатели. Проводили дозированный посев гомогената ткани лёгких на плотную яичную среду Левенштейна—Йенсена; массивность роста МБТ выражали в числе колониеобразующих единиц (КОЕ) на массу лёгких.

Гистологическое исследование лёгких. При гистологическом изучении лёгких орган фиксировали в 10% формалине, заливали в целлоидин—парафин—масло, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Фагоцитоз перитонеальных макрофагов (пМф) исследовали в однослойной культуре (1×10^6 клеток) на пластиковых одноразовых чашках Петри в отношении клеточной взвеси дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^7 клеток), опсонизированных сывороткой мышей. Вычисляли: фагоцитарную активность Мф (ФА) — количество Мф (в %), вовлечённых в фагоцитоз; фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество дрожжей, поглощённых одной фагоцитирующей клеткой; показатель завершённости фагоцитоза (ПЗФ) — количество дрожжей, переваренных макрофагами за 1,5 часа культивирования; индекс завершённости фагоцитоза (ИЗФ) — отноше-

ние фагоцитарного числа за 1 час культивирования к фагоцитарному числу за 2,5 часа культивирования.

Оценка терапевтического эффекта исследуемых веществ. Поскольку у всех тестов поражённости органов туберкулёзной инфекцией увеличение их арифметической величины однонаправлено и означает усиление тяжести поражения, то для сравнения действия субстанций использовали средний суммарный показатель поражённости (ССПП), образованный из суммы частных величин — коэффициента массы лёгких и селезёнки, индекса поражения лёгких и высеваемости МБТ (количество КОЕ) из селезёнки.

Индекс эффективности лечения ИЭ (в %) — долевая разница показателей тяжести течения туберкулёзной инфекции в контрольных группах и в группах животных, получавших исследуемые препараты. Индекс эффективности определяли по формуле:

$$\text{ИЭ, \%} = \frac{n_k - n_0}{n_k} \times 100$$

где n_k и n_0 — средние значения показателей соответственно в контрольной и опытной группах.

При оценке полученных результатов использовали параметрический тест Стьюдента—Фишера [8] и непараметрический метод Уилкоксона—Манна—Уитни [9].

Результаты и обсуждение

Введение животным клинического изолята МБТ 5419 СПбНИИФ вызывала клиническую картину генерализованного туберкулёза с преимущественным поражением лёгких. К моменту промежуточного забоя через 4 недели химиотерапии (на 47-й день после инфицирования) в лёгких заражённых нелеченых животных визуализировались многочисленные сливные милиарные очаги специфического воспаления, что отражалось в высоких значениях индекса поражения лёгких — $3,29 \pm 0,04$ усл. ед., а также среднего суммарного показателя поражённости — $44,57$ усл. ед.

Под влиянием этиотропной терапии на этом сроке отмечено некоторое снижение показателей тяжести течения инфекции: коэффициента массы лёгких в 1,2 раза (с $1,68 \pm 0,2$ усл. ед. в контроле заражения до $1,38 \pm 0,23$ усл. ед.), индекса поражения лёгких в 1,2 раза (с $3,29 \pm 0,04$ до $2,79 \pm 0,09$). Зарегистрировано также достоверное увеличение клиренса лёгких от МБТ в 12,1 раз ($166,2 \pm 20,6$ КОЕ $\times 10^3$ против $13,75 \pm 2,3$ КОЕ $\times 10^3$, $p < 0,001$). Отмечен прирост индексов эффективности по всем исследуемым показателям: по коэффициенту массы лёгких — 17,9%, по индексу поражения лёгких — 15,2%, по коэффициенту массы селезёнки — 8,5%, по высеваемости МБТ из лёгких — 91,7%. При этом средний суммарный показатель поражённости значительно снизился — в 9,4 раза ($4,72$ усл. ед. против $44,57$ усл. ед. у заражённых нелеченых животных).

При назначении ремаксологического лечебного эффекта отмечен только к концу периода наблюдения. При этом через 4 недели терапии регистрировалась лишь тенденция к снижению коэффициента массы лёгких в 1,2 раза ($1,14 \pm 0,12$ усл. ед. против

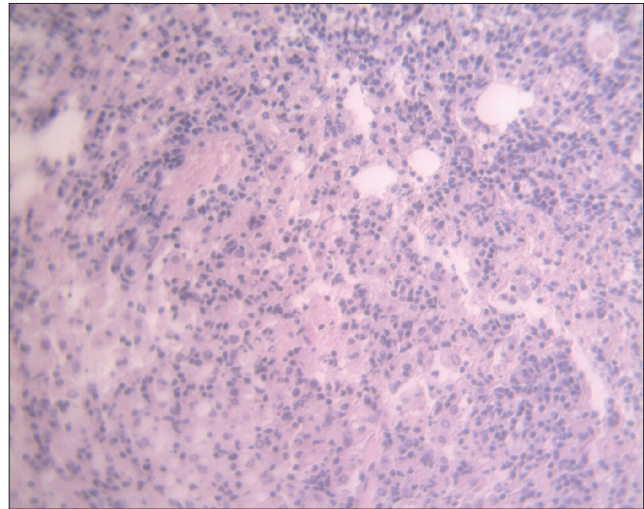


Рис. 1. Лёгкие мыши через 10,5 недель после заражения клиническим изолятом *M.tuberculosis* 5419 СПбНИИФ. Сливные очаги специфической инфильтрации с размытыми границами без чёткой пространственной ориентации клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 600$.

$1,38 \pm 0,23$ усл. ед. в группе контроля лечения), индекса поражения лёгких ($2,46 \pm 0,17$ усл. ед. против $2,79 \pm 0,09$ усл. ед.) и бактериовыделения ($12,1 \pm 1,22 \times 10^3$ КОЕ против $13,75 \pm 2,3 \times 10^3$ КОЕ).

Через 8 недель после начала лечения назначение ремаксолога привело к снижению индекса поражения лёгких в 1,3 раза (до $2,04 \pm 0,15$ усл. ед. против $2,7 \pm 0,05$ усл. ед. в контроле лечения, $p < 0,01$) и уменьшению высеваемости МБТ в 1,5 раза (до $8,1 \pm 1,22$ КОЕ $\times 10^3$ против $12,0 \pm 0,9$ КОЕ $\times 10^3$, $p < 0,05$). По этим показателям зарегистрирован высокий прирост эффективности терапии: 24,4 и 32,5% соответственно. При этом заметно снизился средний суммарный показатель поражённости (в 1,4 раза, до 3,0 усл. ед. против 4,2 усл. ед. у контроля химиотерапии).

При гистологическом исследовании срезов лёгких, проведённых через 10,5 недель после заражения (8 недель от начала комплексной терапии), у инфицированных нелеченых мышей в лёгочной паренхиме выявлено большое количество свежих инфильтративных изменений. Воздушность лёгочной ткани практически у всех животных была снижена значительно, более чем на 50% площади срезов. Очаги инфильтрации сливались, имели размытые границы без чёткой пространственной ориентации клеток (рис. 1). Альвеолы и межальвеолярные перегородки в них заполнены серозным и фибринозным экссудатом и рыхло инфильтрированы лимфоцитами, крупными вакуолизированными (пенистыми) макрофагами и их скоплениями, эпителиоидными клетками, а также нейтрофильными гранулоцитами — признаками альтерации лёгочной ткани. В то же время в лёгочной ткани обнаружены и гранулёмы — плотные очаги ин-

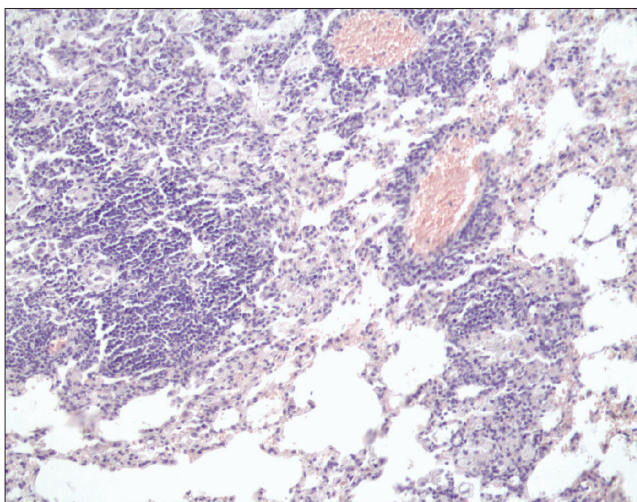


Рис. 2. Эпителиоидно-клеточные гранулёмы и очаги инфильтрации в лёгких мыши, инфицированной клиническим изолятом *M.tuberculosis* 5419 СПБНИ-ИФ, через 8 недель терапии противотуберкулёзными препаратами. Отчетливая периваскулярная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 600$.

фильтрации с чёткими границами, где лимфоциты концентрически расположены вокруг крупных скоплений эпителиоидных клеток. Периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты были выражены слабо.

У всех животных, получавших противотуберкулёзные препараты, распространённость туберкулёзного процесса была значительно меньшей, чем в контроле заражения. Снижение воздушности лёгочной ткани более чем на 50% площади срезов отмечалось гораздо реже, специфическое воспаление потеряло сливной характер и было представлено отдельными некрупными очагами инфильтрации.

При использовании только этиотропной терапии (контроль лечения, группа 3) выраженное снижение воздушности лёгочной ткани зарегистрировано в 3 из 5 случаях (против 5 из 6 в контроле заражения). Инфильтраты состояли из лимфоцитов, макрофагов (в том числе пенистых, собранных в крупные скопления), эпителиальных клеток и их скоплений, единичных нейтрофильных гранулоцитов (в 100%), скоплений нейтрофильных гранулоцитов (в 3 из 6 случаев — 50%). Довольно многочисленные гранулёмы в лёгких всех мышей этой группы содержали крупные скопления эпителиоидных клеток, то есть имели преимущественно эпителиоидно-клеточный характер; периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты стали гораздо более крупными, в то время как перибронхиальные оставались слабо выраженными (рис. 2).

При введении в состав терапии мышей ремаксоло (25 мл/кг) распространённость специ-

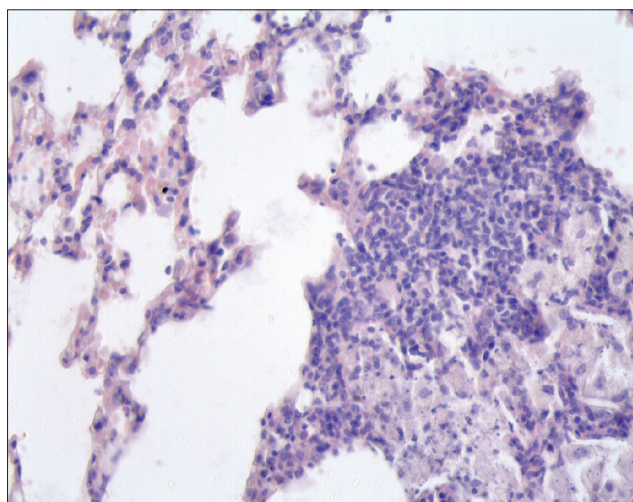


Рис. 3. Очаг инфильтрации в лёгких мыши, инфицированной клиническим изолятом *M.tuberculosis* 5419 СПБНИИФ, через 8 недель комплексной терапии с включением ремаксоло (25 мл/кг). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 600$.

фического воспаления в лёгких так же была меньшей, чем в контроле лечения. При этом снижения воздушности лёгочной ткани более чем на 50% площади срезов не отмечено ни в одном случае, очаги инфильтрации были отдельными, небольшими по площади (рис. 3) и у некоторых мышей (в 2 из 6 случаев) располагались только периваскулярно и перибронхиально. В состав инфильтратов входили лимфоциты, пенистые макрофаги, эпителиальные клетки и их скопления.

Признаков альтерации в специфических инфильтратах практически не регистрировалось. Только в одном случае (16,6%) обнаружены единичные нейтрофильные гранулоциты. Скопления нейтрофильных гранулоцитов ни в одном срезе лёгочной ткани не зафиксировано. Гранулёмы в лёгких этой группы мышей, имели преимущественно лимфоидный характер. Только у 2 из 6 животных, наряду с лимфоидными, обнаружены некрупные эпителиоидно-клеточные гранулёмы с единичными эпителиоидными клетками в центре.

Анализ особенностей фагоцитоза пМф показал, что у заражённых нелеченых мышей на фоне распространённого туберкулёзного поражения лёгочной ткани (47-й день от момента инфицирования) развивается достоверное угнетение как погложительной, так и переваривающей способности Мф по всем изученным показателям. Так, фагоцитарная активность снизилась в среднем до 21,4 против 55,0% у интактных мышей ($p < 0,01$), фагоцитарное число — до 3,0 дрожжевых клеток против 5,4 ($p < 0,01$), ПЗФ — до 35,6 дрожжевых клеток против 178 ($p < 0,01$), индекс завершенности фагоцитоза — до 2,1 усл. ед. против 3,26 усл. ед. ($p < 0,01$).

Под влиянием этиотропной терапии степень подавления фагоцитоза несколько уменьшилась. Через 4 недели от начала терапии у мышей группы контроля лечения отмечено достоверное повышение двух из четырёх изученных показателей: фагоцитарного числа (в среднем 3,68 дрожжевых клеток против 3,0 дрожжевых клеток в группе контроля заражения, $p < 0,05$) и показателя завершённости фагоцитоза (53,7 дрожжевых клеток против 35,6 дрожжевых клеток у заражённых нелеченых мышей, $p < 0,05$).

Однако по двум другим параметрам состояния фагоцитоза показатели оставались достоверно угнетёнными по сравнению с таковыми у здоровых нелеченых мышей (фагоцитарная активность — 26,0 против 55,0%, $p < 0,01$, индекс завершённости фагоцитоза — 2,28 усл. ед. против 3,26 усл. ед., $p < 0,01$) и не отличались от таковых в группе контроля заражения.

Ремаксол через 4 недели применения оказал существенное положительное влияние, как на поглотительную, так и на переваривающую способность пМф, практически нормализовав все четыре изученных параметра. По сравнению с животными контрольной группы у мышей, леченных ремаксолом в составе комплексной терапии, фагоцитарная активность пМф повысилась в 1,6 раза (до 41,2 против 26,0% в контроле лечения, $p < 0,01$), фагоцитарное число — в 1,3 раза (до 4,4 дрожжевых клеток против 3,68, $p < 0,05$), ПЗФ в 2,6 раза (до 138,3 дрожжевых клеток против 53,2, $p < 0,01$) и ИЗФ в 1,4 раза (до 3,09 усл. ед. против 2,28 усл. ед.).

По окончании эксперимента (74-е сутки после инокуляции инфекта) у заражённых нелеченых мышей сохранялось глубокое подавление фагоцитоза пМф по следующим показателям: фагоцитарная активность была снижена в 1,6 раза (34,0 против 56,0% у интактных, $p < 0,01$), фагоцитарное число — также в 1,6 раза (4,17 дрожжевых клеток против 6,65, $p < 0,05$), показатель завершённости фагоцитоза — в 4,7 раза (61,8 дрожжевых клеток против 287,7, $p < 0,01$), индекс завершённости фагоцитоза — в 2,0 раза (2,03 усл. ед. против 4,11 усл. ед., $p < 0,01$).

После 8-недельного курса терапии у мышей, получавших только противотуберкулёзные препараты, по сравнению с 4-недельным регистрировалось дальнейшее повышение параметров фагоцитоза пМф, которое, однако, не привело к восстановлению показателей. При этом усиление фагоцитарной способности пМф наблюдалось уже по трём параметрам: фагоцитарной активности — 53,0 против 34,0%, $p < 0,01$, фагоцитарному

числу — 5,02 дрожжевых клеток против 4,17, $p < 0,05$, индексу завершённости фагоцитоза — 3,13 усл. ед. против 2,03 усл. ед. у заражённых нелеченых животных, $p < 0,05$.

Под действием ремаксолом по окончании курса лечения отмечалась положительная динамика исследуемых показателей. Фагоцитарная функция пМф у мышей, получавших ремаксол, через 8 недель терапии практически по всем параметрам соответствовала уровню интактных животных. Фагоцитарная активность при использовании ремаксолом даже превысила значения интактной группы на 26,1% (70,6 при 56,0% у здоровых мышей), фагоцитарное число составило 99,9% от уровня интактных животных (6,64 дрожжевых клеток против 6,65), показатель завершённости фагоцитоза — 98,2% (272,8 дрожжевых клеток против 287,7 дрожжевых клеток), индекс завершённости фагоцитоза — 86,6% (3,56 усл. ед. при 4,11 усл. ед.). При этом в сравнении с группой мышей, леченных только ПТП, ремаксол значительно усиливал активность пМф по трём из четырёх изученных параметров.

Заключение

Использование на фоне противотуберкулёзных препаратов ремаксолом (25 мл/кг) привело к снижению распространённости туберкулёзного воспаления в лёгких и к исчезновению альтеративного компонента воспаления. Параллельно в этой группе животных наблюдалась активация признаков напряжённости местного иммунитета лёгочной ткани: по изменению клеточного состава гранулём (с преимущественно эпителиоидного на преимущественно лимфоидный) и по более частому обнаружению крупных лимфогистиоцитарных инфильтратов. Приведённые данные по изучению влияния ремаксолом на фагоцитарную функцию пМф свидетельствуют о том, что данный препарат оказал восстанавливающее действие на параметры фагоцитоза, достоверно повысив поглотительную и переваривающую способность пМф в сравнении с группой животных, получавших только противотуберкулёзные препараты.

Установленное в данном исследовании повышение эффективности лечения экспериментального генерализованного лекарственно-устойчивого туберкулёза в результате включения в состав базовой противотуберкулёзной терапии ремаксолом позволяет обосновать целесообразность изучения его эффективности в клинической практике с целью расширения показаний к применению во фтизиатрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Васильева И. А., Самойлова А. Г., Багдасарян Т. Р. и др.* Зависимость результатов лечения больных туберкулёзом лёгких от спектра лекарственной устойчивости возбудителя. Туб бол лег 2011; 10: 28—32.
2. *Лядова И. В., Гергерт В. Я.* Реакции Т-клеточного иммунитета при туберкулёзе: экспериментальные и клинические исследования. Пробл туб 2009; 11: 9—18.
3. *Easton D. M., Nijnik A., Hancock R. E. W.* Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. Trends Biotechnol 2009; 27: 10: 582—590.
4. *Сологуб Т. В., Горячева Л. Г., Суханов Д. С. и др.* Гепатопротективная активность ремаксоло при хронических поражениях печени. Клини мед 2010; 1: 62—66.
5. *Суханов Д. С., Виноградова Т. И., Заболотных Н. В. и др.* Сравнительное изучение гепатопротективного действия ремаксоло, ремберина и адеметионина при повреждении печени противотуберкулёзными препаратами. Антибиотики и химиотер 2011; 56: 1: 13—18.
6. *Виноградова Т. И., Витовская М. Л., Заболотных Н. В., Васильева С. Н.* Экспериментальная оценка комплексной терапии лекарственно-устойчивого туберкулёза. Актуальные вопросы выявления, диагностики и лечения внелёгочного туберкулёза: Науч труды Всерос науч-практ конф. СПб.: 2006; 253—257.
7. *Александрова А. Е., Ариэль Б. М.* Оценка тяжести туберкулёзного процесса в лёгких мышей. Пробл. туб 1993; 3: 52—53.
8. *Урбах В. Ю.* Статистический анализ в биологических медицинских исследованиях. М.: 1975.
9. *Гублер Е. В.* Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: 1978.

Изучение фенотипической активности изофермента CYP3A4 у детей

Б. И. КАНТЕМИРОВА¹, А. Х. ЧЕРНЫШЕВА¹, А. К. СТАРОДУБЦЕВ², Д. А. СЫЧЕВ²

¹ Кафедра педиатрии лечебного факультета и Кафедра фармакологии Астраханской государственной медицинской академии, Астрахань

² Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

Study on Phenotypical Activity of Isoenzyme CYP3A4 in Children

B. I. KANTEMIROVA, A. KH. CHERNYSHEVA, A. K. STARODUBTSEV, D. A. SYCHEV

Department of Pediatrics and Department of Pharmacology, Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan, Astrakhan

Department of Clinical Pharmacology and Propedeutics of Internal Diseases,

I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, Moscow

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определена концентрация кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче 30 соматически здоровых детей. По соотношению 6-β-гидрокортизол/кортизол определена активность изофермента CYP3A4 цитохрома P450. Выявлена различная степень активности CYP3A4 у детей в зависимости от возраста и пола. В возрасте от 4 до 9 лет показатель соотношения 6-β-гидрокортизол/кортизол составил $9,21 \pm 0,67$, что статистически достоверно выше, чем у детей от 0 до 3 лет ($p < 0,001$). У детей женского пола в возрасте от 0 до 3 лет показатель активности изофермента CYP3A4 был достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с детьми женского пола более старших групп и детьми мужского пола от 0 до 3 лет. Полученные результаты могут использоваться для дальнейших исследований с целью совершенствования процесса дозирования лекарственных препаратов и предупреждения возникновения нежелательных побочных реакций.

Ключевые слова: ксенобиотики, биотрансформация, цитохром P450, изофермент CYP3A4.

The urine levels of cortisol and 6-β-hydroxycortisol in 30 healthy children were determined with high performance liquid chromatography. The activity of cytochrome P450 isoenzyme CYP3A4 was estimated by the ratio of 6-β-hydroxycortisol and cortisol. Differences in the CYP3A4 activity depended on the age sex. At the age of 4 to 9 years the value of the ratio was 9.21 ± 0.67 which in fact was statistically higher than that in the children at the age of 0 to 3 years ($p < 0.001$). In the female children at the age of 0 to 3 years the value of the isoenzyme CYP3A4 activity was actually lower ($p < 0.05$) vs. the female children of the higher ages and the male children at the age of 0 to 3 years. The results are useful for further researches on improvement of drugs dosing and prevention of adverse reactions.

Key words: xenobiotics, biotransformation, cytochrome P450, isoenzyme CYP3A4.

Введение

В последние десятилетия, в связи с интенсивными темпами роста химической, пищевой и фармацевтической промышленности, в своей жизнедеятельности человек постоянно встречается с огромным количеством новых соединений и ксенобиотиков. Результат эндогенного взаимодействия организма с химическими агентами окружающей среды индивидуален и зависит от генетической предрасположенности, возраста, пола, этнической принадлежности, состояния здоровья, индивидуальных особенностей метаболизма, образа жизни и свойств назначаемых лекарственных препаратов [1–4].

По некоторым оценкам, от 50 до 90% неблагоприятных фармакологических ответов определяется генетическими особенностями [1, 2, 5, 6]. Химические соединения, попавшие в организм, подвергаются метаболизму посредством ферментных систем биотрансформации. Активность этих ферментов предопределяет протекание процесса обезвреживания токсичных соединений и их метаболитов. Основные процессы биотрансформации химических веществ происходят в печени при участии изоферментов системы цитохрома P450 [2, 3, 7].

В педиатрии процессы метаболизма лекарственных средств (ЛС) в различные возрастные периоды имеют свои особенности. У новорожденных детей значительно снижена активность ферментов первой и второй фазы биотрансформации. Повышение активности метаболизма

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121. Астраханская государственная медицинская академия

Таблица 1. Содержание кортизола, 6-β-гидрокортизола и активность СУРЗА4 по соотношению 6-β-гидрокортизол/кортизол мочи у детей в различные возрастные периоды

Показатели	Возрастные периоды, лет		
	0—3	4—9	9—17
6-β-гидрокортизол мочи, мкг/мл	160,58±18,53	164,53±30,88	171,28±28,69
Кортизол мочи, мкг/мл	30,18±2,73	29,06±3,90	25,11±3,92
6-β-гидрокортизол / кортизол мочи	5,58±0,47*** $p_1 < 0,001$	9,21±0,67***,* $p_1 < 0,001$	5,83±1,22* p_2 — НД $p_3 < 0,05$

Примечание. p_1 - достоверность различий между показателями соотношения 6-β-гидрокортизол/кортизол мочи детей от 0 до 3-х лет и детей от 4-х до 9 лет; p_2 - достоверность различий между показателями соотношения 6-β-гидрокортизол/кортизол мочи детей от 0 до 3 лет и детей от 9 до 17 лет; p_3 — достоверность различий между показателями соотношения 6-β-гидрокортизол/кортизол мочи детей от 4-х до 9 лет и детей от 9 до 17 лет; *** — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$; * — $p < 0,05$.

ЛС последовательно возрастает к 2—3 годам. Некоторые ферментные системы печени созревают к 18—20-летнему возрасту [8]. В этой связи актуальным является изучение активности системы биотрансформации в зависимости от возраста с целью совершенствования процесса дозирования лекарственных препаратов и предупреждения возникновения нежелательных побочных реакций.

Изофермент СУРЗА4 метаболизирует более 60% всех лекарственных препаратов, включая антибактериальные ЛС, катализирует реакцию 6-β-гидроксилирования эндогенных стероидов, в том числе тестостерона, прогестерона, кортизола [2—4, 9].

СУРЗА4 не определяется в печени новорожденных, к четвертому месяцу жизни возрастает до 40% от взрослого уровня и до 72% к 12 месяцам жизни [10, 11]. Выявлено, что основной рост активности происходит в первые два с половиной года жизни, а после 5 лет темпы роста снижаются [4]. Освещение вопросов изучения фенотипической и физиологической активности СУРЗА4 у детей в зависимости от возрастных периодов и пола в доступной литературе мы не встретили.

Учитывая участие СУРЗА4 в метаболизме большинства лекарственных препаратов и эндогенных стероидов, возрастную изменчивость, немногочисленные данные литературы, нам представилось важным изучить активность изофермента СУРЗА4 в зависимости от пола и возраста детей.

Цель исследования — изучить активность изофермента СУРЗА4 по соотношению 6-β-гидрокортизола к кортизолу мочи в зависимости от возраста и пола детей.

Материал и методы

Оценку активности изофермента СУРЗА4 цитохрома Р450 печени осуществляли путём вычисления соотношения 6-β-гидрокортизола к кортизолу мочи. Кортизол мочи и его метаболит 6-β-гидрокортизол определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии у 30 соматически здоровых детей. Возраст детей составлял от 0 до 17 лет, из них женского пола — 12 человек, мужского — 18.

Результаты и обсуждение

Наименьшая активность СУРЗА4 по соотношению 6-β-гидрокортизол/кортизол мочи выявлена в группе детей от 0 до 3 лет — 5,58±0,47. В дальнейшем отмечалось увеличение данного показателя в группе детей 4-9 лет до 9,21±0,67 ($p < 0,001$ по сравнению с детьми от 0 до 3-х лет). В старшей возрастной группе у детей 9—17 лет данный показатель был ниже, чем у детей от 4 до 9 лет и составил 5,83±1,22 ($p < 0,05$), что, по-видимому, можно объяснить различной фенотипической активностью СУРЗА4 в различные возрастные периоды. Можно предположить, что наиболее «безопасным» периодом в плане метаболизма лекарственных средств, биотрансформирующихся при участии СУРЗА4, является период от 4 до 9 лет, когда активность изофермента СУРЗА4 максимальная (табл. 1).

При сравнении показателей активности СУРЗА4 в зависимости от пола в каждой возрастной группе (табл. 2) оказалось, что наименьшая активность изофермента СУРЗА4 наблюдалась у детей женского пола в возрасте от 0 до 3 лет — 4,93±0,92. В дальнейшем, в возрастном периоде от 4 до 9 лет данный показатель максимально увеличивался и составлял 10,07±2,30 (разница статистически достоверна — $p < 0,05$). В возрасте от 9 до 17 лет показатель активности СУРЗА4 у детей женского пола составлял 9,91±3,45.

Следовательно, наиболее уязвимыми в плане возникновения нежелательных побочных реакций, по данным нашего исследования, являются дети женского пола в возрасте от 0 до 3-х лет.

Активность СУРЗА4 у детей мужского пола, в зависимости от возраста, менялась противоположно смене активности СУРЗА4 у детей женского пола. Максимальная активность в нашем исследовании была выявлена в возрасте от 0 до 3 лет, с дальнейшим некоторым уменьшением к 4—9 годам. В возрасте 9—17 лет активность СУРЗА4 у детей мужского пола практически не менялась (см. табл. 2).

Таблица 2. Содержание кортизола, 6- β -гидрокортизола и активность CYP3A4 по соотношению 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи у детей в разные возрастные периоды в зависимости от пола ребенка

Показатели	Возрастные периоды, лет		
	0—3	4—9	9—17
Дети женского пола			
6- β -гидрокортизол мочи (мкг/мл)	157,12 $\pm$ 31,57 (n=5)	191,5 $\pm$ 26,17 (n=3)	163,93 $\pm$ 29,46 (n=4)
Кортизол мочи (мкг/мл)	31,45 $\pm$ 1,91 (n=5)	22,87 $\pm$ 6,39 (n=3)	20,27 $\pm$ 3,96 (n=4)
6- β -гидрокортизол/кортизол мочи	4,93 $\pm$ 0,92*	10,07 $\pm$ 2,30*	9,91 $\pm$ 3,45
	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$	p_3 — НД
	p_2 — НД	p_8 — НД	p_9 — НД
	p_7 — НД		
Дети мужского пола			
Содержание 6- β -гидрокортизола (мкг/мл)	163,06 $\pm$ 23,41 (n=7)	152,97 $\pm$ 27,22 (n=7)	178,63 $\pm$ 23,41 (n=4)
Содержание кортизола в моче (мкг/мл)	26,12 $\pm$ 4,08 (n=7)	26,49 $\pm$ 3,45 (n=7)	29,96 $\pm$ 23,41 (n=4)
6- β -гидрокортизол/кортизол мочи	6,58 $\pm$ 0,70	6,22 $\pm$ 1,36	5,83 $\pm$ 1,21
	p_4 — НД	p_5 — НД	p_6 — НД

Примечание. p_1 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей женского пола от 0 до 3-х лет и детей женского пола от 4-х до 9 лет; p_2 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей женского пола от 0 до 3-х лет и детей женского пола от 9 до 17 лет; p_3 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей женского пола от 4-х до 9 лет и детей женского пола от 9 до 17 лет; p_4 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей мужского пола от 0 до 3-х лет и детей мужского пола от 4-х до 9 лет; p_5 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей мужского пола от 0 до 3-х лет и детей мужского пола от 9 до 17 лет; p_6 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей мужского пола от 4-х до 9 лет и детей мужского пола от 9 до 17 лет; p_7 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей женского пола от 0 до 3-х лет и детей мужского пола от 0 до 3-х лет; p_8 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей женского пола от 4-х до 9 лет и детей мужского пола 4-х до 9 лет; p_9 — достоверность различий между показателями соотношения 6- β -гидрокортизол/кортизол мочи детей женского пола от 9 до 17 лет и детей мужского пола 9 до 17 лет; *** — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$; * — $p < 0,05$.

Вывод

Проведённое нами исследование показало различную степень активности изофермента CYP3A4 в зависимости от пола и возраста детей.

Данные особенности, на наш взгляд, являются результатом различия возрастных и половых при-

способительных реакций, заслуживают пристального внимания и нуждаются в более глубоком изучении на большей по численности группе исследования, с целью совершенствования процесса дозирования лекарственных препаратов и предупреждения возникновения нежелательных побочных реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В. С., Баранова Е. В., Иващенко Т. Э., Асеев М. В. Геном человека и гены «предрасположенности». СПб.: 2000; 272.
2. Кулес В. Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М.: 2004; 144.
3. Кулес В. Г., Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатъев И. В. Фармакогеномика системы биотрансформации транспортеров лекарственных средств: от теории к практике. Биомедицина 2007; 6: 29—46.
4. Шепотина Е. Г. Полиморфизм генов цитохрома P450 подсемейства 3A и вариabельная активность CYP3A4: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2008; 24.
5. Steinbrook R. Testing medications in children. N Eng J Med. 2002; 347: 18.
6. William E. E., Pharm.D., Howard L. M. Pharmacogenomics — drug disposition, drug targets, and side effects. N Engl J Med 2003; 348: 538—549.
7. Кулес В. Г., Грачев С. В., Сычев Д. А. Метаболизм лекарственных средств. Науч основ персонализир мед 2008; 304.
8. Зборовский А. Б., Тюренков И. Н. Осложнения фармакотерапии. Руководство для врачей. М.: 2003; 544.
9. Смирнов В. В., Савченко А. Ю., Раменская Г. В. Разработка методики количественного определения эндогенного кортизола и 6- β -гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP 3A4. Биомедицина 2010; 4: 56—60.
10. Johnson T. N., Rostami-Hodjegan A., Tucker G. T. Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children. Clin Pharmacokinet 2006; 45: 9: 931—956.
11. Johnson T. N., Rostami-Hodjegan A., Tucker G. T. Development of CYP2D6 and CYP3A4 in the first year of life. Clin Pharmacol Ther 2007; 81: 4: 510—516.

Оценка безопасности и фармакотерапевтической эффективности применения циклоферона при лечении астраханской риккетсиозной лихорадки

Ю. В. ШЕРЫШЕВА, Х. М. ГАЛИМЗЯНОВ, А. Л. КОВАЛЕНКО

Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань
НТФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

Evaluation of Safety and Pharmacotherapeutic Efficacy of Cycloferon in Treatment of Astrakhan Rickettsial Fever

YU. V. SHERYSHEVA, KH. M. GALIMZYANOV, A. L. KOVALENKO

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan
POLYSAN Co., St. Petersburg

Проанализировано клинко-патогенетическое влияние индуктора эндогенного интерферона — циклоферона на течение астраханской риккетсиозной лихорадки (АРЛ), её осложнений и исходов. Оптимизирована схема лечения АРЛ при включении в комплексную терапию циклоферона; показана особенность клинического течения и уровень интерфероновой статусности больных АРЛ при монотерапии циклофероном, а также при сочетании стандартной терапии и циклоферона. Установлено, что у больных АРЛ средней тяжести совместное использование циклоферона со стандартной терапией быстрее купирует клиническую симптоматику болезни (лихорадку, головную боль, слабость, сыпь, гепатомегалию, артралгии и миалгии, увеличение лимфоузлов, первичный аффект), уменьшает длительность нахождения больных в стационаре по сравнению со стандартной терапией. Показано, что у больных АРЛ средней тяжести до лечения наблюдается снижение суточного содержания α -интерферона (α -ИФН) и увеличение γ -ИФН. Включение в схему лечения циклоферона приводит к увеличению содержания α -ИФН и снижению количества повышенного γ -ИФН. При сочетании стандартной терапии с циклофероном у больных АРЛ средней тяжести происходит изменение иммунного статуса: увеличение содержания относительного количества Т- и В-лимфоцитов и нормализация их абсолютного количества. Отмечена нормализация фагоцитарной активности и коэффициента активных фагоцитов, увеличение фагоцитарного числа, увеличение уровней иммуноглобулинов G, A и M и количества ЦИК. У больных АРЛ средней тяжести стандартная терапия с циклофероном приводит к нормализации не только СДГ, ЛДГ и Г-6-ФДГ, но и также АЭ и БЭ в нейтрофилах, а также всего спектра ферментов моноцитов, за исключением НАД-диафоразы. Нежелательные реакции отмечены в 2,5% случаев (9 человек), все они были лёгкой степени и отмены препаратов не потребовали.

Ключевые слова: астраханская риккетсиозная лихорадка, индукторы интерферона, циклоферон, доксициклин, нежелательные побочные реакции.

Clinicopathogenetic impact of cycloferon, an endogenous interferon inducer, on the process of Astrakhan rickettsial fever, its complications and outcomes was analysed. The treatment scheme with addition of cycloferon to the complex therapy was optimized. The specificity of the disease clinical process and the level of the interferon status in the patients treated with cycloferon alone or with combination of the standard therapy and cycloferon was shown. It was observed that in the patients with moderate severity of the disease the combined use of the standard therapy and cycloferon was in favour of arresting the disease clinical signs (fever, headache, weakness, eruption, hepatomegaly, arthralgia and myalgia, lymphatic gland inflammation, primary affect) and lowered the hospitalization term vs. the standard therapy alone. In the patients with moderate severity of the disease the levels of the serous interferon- α before the treatment were found lower, while those of interferon- γ were higher. The use of cycloferon in the treatment scheme resulted in increase of the interferon- α levels and decrease of the higher levels of interferon- γ . The standard therapy in combination with cycloferon in the patients with moderate severity of the disease provided changes in the immune status: increase of the relative content of T- and B-lymphocytes and normalization of their absolute number. Normalization of the phagocytic activity and the coefficient of the active phagocytes, as well as increase of the phagocytic index, the levels of immunoglobulins G, A and M and the number of the circulating immune cells were stated. The standard therapy with addition of cycloferon resulted in normalization of the levels not only of succinic dehydrogenase, lactate dehydrogenase and glucose-6-dehydrogenase but also of alpha-naphthylacetate esterase and alpha-naphthylbutyrate esterase in the neutrophils, as well as of the whole spectrum of the monocyte enzymes, except NAD-diaphorase. The adverse reactions were observed in 2.5% of the cases (9 subjects). All of them were mild and did not require discontinuation of the drugs use.

Key words: Astrakhan rickettsial fever, interferon inducers, cycloferon, doxycycline, adverse reactins.

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 414000 г. Астрахань, ул. Бакин-
ская, 121. Астраханская медицинская академия

Введение

Клещевые пятнистые лихорадки (КПЛ), такие как лихорадка скалистых гор [1], средиземноморская пятнистая лихорадка, марсельская лихорадка, клещевой риккетсиоз Северной Азии и др., известны давно [2—6]. За последние годы во многих странах мира, в том числе и в России отмечается рост заболеваемости риккетсиозами группы КПЛ, сопровождающийся расширением ареала распространения уже известных нозологических форм. С 1983 года рост заболеваемости, возрос за десятилетие в 20 раз [7, 8]. Описаны природные очаги риккетсиозов, вызванные вновь открытыми возбудителями (тайландская, австралийская, японская, израильская лихорадка), а также Астраханская риккетсиозная лихорадка (АРЛ).

Изучение АРЛ начинается с 1970-х годов, когда впервые были зарегистрированы спорадические случаи этого заболевания, сопровождающегося фебрильной температурой и экзантемой. Сначала его рассматривали как вирусную экзантему неустановленной этиологии [9].

Неослабевающий интерес многих исследователей к АРЛ позволил изучить эпидемиологию, клинику, патоморфологические изменения кожи, патогенетическое значение белков острой фазы. Удалось установить закономерности специфической и неспецифической защиты при АРЛ, связь эндокринной регуляции иммунного ответа и значимость генноинженерных препаратов интерферона (ИФН) в устранении нарушений клеточного иммунитета и неспецифической защиты, влиянии на гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) и в предотвращении аутосенсibilизации, установить маркёры предрасположенности и резистентности к АРЛ.

Эпидемиологические исследования установили переносчика риккетсий — клеща *Rhipicephalus pumilio*, определили сезонные особенности заболеваемости и основные эпидемиологические факторы АРЛ [7, 10]. Источниками и резервуарами инфекции при данном заболевании могут быть в первую очередь дикие животные: ежи, зайцы, мышь-белозубка, гребешковая мышь, а от них клещ может попасть на домашних животных — собак, кошек, коров [7, 11—14].

Передача риккетсий при АРЛ осуществляется трансмиссивным механизмом, который реализуется через присасывание клеща *Rh.pumilio* имаго или нимфы. Клещ может попасть на человека с собаки, ежа или другого животного, а также возможно непосредственное нападение на людей с поверхности почвы или растений, либо через аэрозольную взвесь [15—17]. Не исключается передача инфекции через слизистые оболочки глаза при втирании риккетсий [18], а также через повреждённую кожу рук при раздавливании клеща [7, 10, 19].

Лечение больных АРЛ включает в себя комплекс мероприятий: постельный режим, диетическое питание, этиотропную, патогенетическую и симптоматическую терапию. В качестве этиотропной терапии проводится лечение антибиотиками с противориккетсиозной активностью. К таким препаратам относятся рифампицин, доксициклин и левомицетин (хлорамфеникол).

В клинической практике при лечении АРЛ установлена эффективность генноинженерных препаратов ИФН в комплексе с доксициклином. Экспериментально доказано, что под влиянием γ -ИФН и фактора некроза опухолей (ФНО) внутриклеточно накапливается оксид азота, который оказывает губительное действие на риккетсий [20]. Под влиянием интерферона клетка способна синтезировать фермент, разрушающий, например, РНК вируса, тем самым нарушая синтез белков в гранулярной эндоплазматической сети [21—24].

Однако лечение интерферонами ограничено из-за значительного количества побочных эффектов: гриппоподобного синдрома, сахарного диабета, заболеваний щитовидной железы, депрессии, мышечно-суставных и головных болей [3, 25].

Менее агрессивными считают препараты, стимулирующие эндогенную выработку интерферонов. Эффективным низкомолекулярным индуктором интерферона является циклоферон, обладающий способностью вызывать образование α -, β - и γ -ИФН в организме, что определяет широкий спектр его биологической активности — противовирусной, иммуномодулирующей, противовоспалительной. Он быстро проникает в клетки, накапливаясь в ядре и цитоплазме. Хорошо взаимодействует с ДНК клетки, с чем связан механизм его интерферониндуцирующей активности. Циклоферон обладает низкой токсичностью. Отсутствие мутагенного, тератогенного, эмбриотоксического, канцерогенного и других токсических эффектов делает возможным широкое применение препарата.

Цель настоящего исследования — комплексное изучение элементов цитокинового статуса, ферментативной активности фагоцитов крови, цитохимических и иммунологических показателей при комбинированном лечении больных АРЛ, с использованием индукторов эндогенного интерферона, в частности циклоферона, что позволит оптимизировать и повысить эффективность лечения больных АРЛ, занимающей важное место в краевой инфекционной патологии.

Материал и методы

Обследованы 364 больных, страдающих астраханской риккетсиозной лихорадкой средней степени тяжести, в возрасте от 18 до 75 лет. В 90,5% случаев диагноз верифицирован серологически в РНИФ в титрах 1:20 — 1:640 в парных сыворотках с видоспецифическим корпускулярным антигеном из астраханского штамма риккетсий. У остальных 9,5% пациен-

тов диагноз поставлен на основании клинико-эпидемиологических данных.

Больные рандомизированно были разделены на 3 группы:

- I группу ($n=118$) составили пациенты, получавшие терапию с доксициклином (стандартное лечение) и плацебо;
- II группу ($n=122$) составили больные, получавшие стандартное лечение и индуктор интерферона — циклоферон (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург);
- III группа ($n=124$) больных получала циклоферон в виде монотерапии.

Контрольную группу составили 90 здоровых лиц в возрасте от 19 до 60 лет.

Циклоферон назначали из расчёта 10 мг/кг массы тела по 4 таблетки (600 мг) на 1-, 2-, 4-, 6-, 8-е сутки один раз в день. Курсовая доза 3000 мг.

Доксициклин назначали внутрь в суточной дозе 200 мг в первый день (по 100 мг 2 раза в сутки), далее — по 100 мг в сутки (за 1 приём). Курсовая доза составляла 600 мг, длительность курса — 5 дней.

Работа выполнена на базе Астраханской областной инфекционной клинической больницы при участии Красноярской ЦРБ Астраханской области, Наримановской ЦРБ Астраханской области, Приволжской ЦРБ Астраханской области.

В исследовании выделены 2 базовые точки — до начала исследования и по окончании терапии. Оценке подлежали нижеследующие лабораторные тесты.

Цитохимические тесты. В нейтрофилах и моноцитах крови больных АРЛ и здоровых доноров определяли: активность окислительно-восстановительных ферментов по Нарциссову Р. П. (1981): сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6 ФДГ); активность ферментов транспорта электронов кислорода определяли по Нарциссову Р.П. (1981): НАД-диафоразы (НАД) и НАДФ-диафоразы (НАДФ); эстеразную активность определяли по Вагштейну В. М. и Вольфу Ф. Г. (1973): альфанафтилacetатэстеразы (АЭ) и альфанафтилбутиратэстеразы (БЭ).

Результаты цитохимических реакций оценивали не только по процентному содержанию положительно реагирующих клеток, но и полуколичественным методом Karlow [1955].

Иммуноферментный анализ. Исследование α - и γ -ИФН осуществлялось методом ИФА с помощью тест-систем, выпускаемых ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург).

Иммунологические тесты. Количественное определение содержания иммуноглобулинов А, G и М проводили методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [26].

Определение содержания Т-лимфоцитов осуществлялось методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана. Количественное определение В-лимфоцитов проводили методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами мышей. Определение показателей фагоцитоза (ФА, ФЧ, КАФ) и фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов проводили в тесте с латексом.

Клинический анализ крови с подсчётом лейкоцитарной формулы; электрокардиография, рентгенография органов грудной клетки и УЗИ органов брюшной полости проводили по показаниям.

Математическая обработка цитохимических исследований проводилась на персональном компьютере Pentium в программе Microsoft Excel.

В течение всего времени наблюдения врач-исследователь фиксировал все нежелательные побочные явления, возникающие у пациента во время и после инфузии препарата в течение 12 суток наблюдения. Оценивалась связь и тяжесть неже-

лательных явлений с исследуемым препаратом, а также является ли нежелательное явление серьёзным (в соответствии с нижепредставленными данными).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью прикладной программы для Windows 98 — Microsoft Excell. Определяли среднюю арифметическую (M), среднюю ошибку (m), достоверность сравниваемых данных между группами оценивали с помощью критерия достоверности Стьюдента (t); статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Заболевание проявлялось ознобом и лихорадкой с различной степенью выраженности, чаще в первые дни до 38—39°C. Длительность лихорадки у больных II и III групп не различалась, но была достоверно короче, чем у больных I группы.

Головная боль — наиболее часто встречаемый симптом (у 94,2% пациентов), что свидетельствует о высокой степени интоксикации при АРЛ, наиболее быстро она исчезала у больных II группы.

Слабость отмечали у всех групп больных АРЛ, наиболее быстро этот симптом купировали у больных II и III групп. Бессонницу, отмеченную у 19,5% больных, купировали в течение $5,37 \pm 0,9$ дней, наиболее длительное нарушение сна наблюдали в I группе. Анорексию отмечали практически у всех больных, независимо от вида терапии. Сыпь (как известно, патогномоничный признак АРЛ) выявляли у всех больных на туловище (100%) и на конечностях (верхних — 98,6%, нижних — 100%, ладонях 30,5%, подошвах — 37,4%). Наиболее быстрый ответ наблюдали у больных II группы, более длительно сыпь сохранялась у больных I группы. Длительность гиперемии зева сохранялась при всех схемах лечения. В 36,8% случаев наблюдали тахикардию, а в 37,6% случаев брадикардию, у 70,3% пациентов тоны сердца были приглушены, у 18,7% больных отмечался кашель и сухие хрипы в лёгких. Тошнота выявлена у 10,9%, рвота — у 3% больных АРЛ. У 45,6% больных АРЛ отмечали гепатомегалию, которая уменьшалась в группах больных, принимавших циклоферон. Суставные боли у больных АРЛ отмечали довольно часто — в 84,1% случаев. Продолжительность болей в крупных суставах была короче в II и III группах, по сравнению с получавшими лечение в I группе. Длительность болей в мелких суставах быстрее купировали во II и III группах. Небольшое увеличение лимфоузлов отмечали у 31,9% больных АРЛ, с выраженной положительной динамикой у больных II и III групп.

В таблице представлены данные о сроках нахождения больных в стационаре.

Сроки стационарного лечения больных АРЛ средней тяжести при разных видах лечения ($M \pm m$)

Группы больных	Средний койко-день	p
I группа, $n=118$	$10,5 \pm 0,30$	$p_{1-2} < 0,05$
II группа, $n=122$	$7,9 \pm 0,23$	
III группа, $n=124$	$9,5 \pm 0,63$	

Выявлено, что больные II группы достоверно меньше находились в стационаре по сравнению с больными I группы.

При исследовании показателей гомеостаза у больных АРЛ выявлен классический тип иммунограммы — нейтрофильно-лимфоцитарный.

При всех видах лечения происходило увеличение среднесуммарного относительного содержания Т- и В-лимфоцитов в 1,3—1,4 раза и 1,3—1,8 раза соответственно по сравнению с контрольными значениями. Абсолютное количество Т-лимфоцитов также было больше, чем в контроле в 1,4—1,6 раза при всех видах лечения. Аналогично отмечали увеличение среднесуммарного относительного содержания В-лимфоцитов в 1,9—2,2 раза при всех видах лечения. Абсолютное количество В-лимфоцитов в III группе больных не отличалось от этого показателя в контрольной группе. Напряженность иммунитета зависела от сроков болезни и проводимого лечения. Так, на протяжении 1—3 недель лечения наблюдали по сравнению с контролем увеличение относительного содержания Т-лимфоцитов в 1,2—1,4 раза, при этом абсолютное их количество увеличивалось в 1,3—1,4 раза на 1-й неделе болезни у больных II группы, при остальных видах лечения их содержание не отличалось от контрольной группы. На 2—3-й неделе АРЛ абсолютное количество Т-лимфоцитов увеличивалось по сравнению с контролем в 1,2—1,9 раза. Абсолютное количество В-лимфоцитов на 1-й неделе АРЛ между группами достоверно не различалось. На второй и третьей неделях АРЛ абсолютное количество В-лимфоцитов достигало показателей контрольной группы во всех группах больных.

Среднесуммарный уровень Ig G при всех видах лечения и на протяжении первой, второй и третьей недель болезни превышал контрольные показатели в 1,2—1,4 раза. Среднесуммарный уровень Ig A у больных I и III групп был сопоставим с показателями контрольной группы, а у больных II группы увеличивался в 1,2—1,3 раза. Среднесуммарный уровень Ig M при всех видах лечения не отличался от показателей контрольной группы.

Среднесуммарное содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в I и II группах не отличалось от контрольных показателей. На первой неделе болезни у этих больных происходило снижение содержания ЦИК в 1,6—2,9 раза по сравнению с контролем. Монотерапия циклофероном увеличивала содержание ЦИК в 1,7—1,9 раза по сравнению с показателями больных I и II групп. На второй неделе терапии у этой группы больных АРЛ содержание ЦИК также увеличивалось в 1,5—2,1 раза. Уровень ЦИК у больных I и II групп на второй неделе приближался к показателям контрольной группы.

На третьей неделе АРЛ содержание ЦИК увеличивалось у больных I и III групп в 1,4 и 1,7 раза

и сохранялось на уровне контрольных значений у больных II группы.

Среднесуммарная фагоцитарная активность (ФА) снижена у больных I группы, а у больных II и III групп не отличалась от контрольной группы. Среднесуммарная величина фагоцитарного числа (ФЧ) при всех видах лечения была выше в 1,2—1,3 раза, чем в контрольной группе. Среднесуммарный коэффициент активных фагоцитов (КАФ) у II и III групп был сопоставим, а у больных I группы снижался в 1,5 раза по сравнению с контрольным показателем.

Следовательно, у больных АРЛ средней тяжести уровни показателей иммунного статуса (Т- и В-лимфоциты, ФА, ФЧ, КАФ, Ig A, G, M) зависели от проводимого лечения и сроков болезни. У больных II группы наблюдали увеличение относительного и нормализацию абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов, нормализацию фагоцитарной активности и коэффициентов активных фагоцитов, увеличение фагоцитарного числа, увеличение уровня Ig A, увеличение ЦИК.

Анализ содержания сывороточного α - и γ -ИФН показал, что у больных АРЛ средней тяжести до начала лечения количество α -ИФН в 1,5 раза было меньше, а γ -ИФН в 1,6 раза больше, чем в контроле. Уровень α -ИФН при лечении больных II группы увеличивался в 1,35 раза по сравнению с исходными показателями. Содержание γ -ИФН снижалось в 1,1—1,5 раза. Терапия у больных II группы приводила к нормализации уровня — γ -ИФН и α -ИФН.

Большое значение для неспецифической защиты организма имеет функциональное состояние лейкоцитов. Нами изучена ферментативная активность макрофагов при АРЛ в зависимости от проводимой терапии. Использовали показатели функциональной активности, суммарную активность отдельных групп ферментов дегидрогеназ, диафораз и эстераз.

Установлено, что в нейтрофилах больных АРЛ средней тяжести наибольшие изменения активности отмечались у дегидрогеназ и эстераз. Терапия больных II группы, в отличие от терапии у больных I группы, позволяла вернуть функциональную суммарную активность дегидрогеназ к нормальным значениям.

Суммарная дегидрогеназная активность моноцитов, сниженная до лечения, после применения стандартной терапии практически не менялась.

Суммарная диафоразная активность нормализовывалась при стандартной терапии. Положительное влияние на неё оказывало и применение комбинации доксициклина с циклофероном. Аналогичный лечебный эффект наблюдался при анализе суммарной эстеразной активности. Так, стандартная терапия позволяла повысить её, но наилучший эффект достигался при применении

дополнительно циклоферона, по сравнению с контрольной группой.

Кроме того, мы провели качественный анализ показателей суммарной активности вышеперечисленных ферментов в нейтрофилах и моноцитах больных АРЛ при различных схемах лечения. При стандартной терапии доксициклином происходило перераспределение суммарной дегидрогеназной активности в нейтрофилах. Но при других схемах лечения АРЛ по количеству гранул диформаза нейтрофилы относились к группе «а». При использовании в терапии сочетания доксициклина и циклоферона суммарная дегидрогеназная активность была близка к контролю.

В моноцитах наблюдалась сходная динамика суммарной активности дегидрогеназ.

Суммарная диафоразная активность в нейтрофилах у больных АРЛ при поступлении была крайне низка, но характер распределения гранул диформаза соответствовал степени «в». Суммарная диафоразная активность во II группе имела качественные особенности: помимо нейтрофилов степени «а», имелись и нейтрофилы степени «б». Лечение АРЛ только циклофероном также позволяло выявить качественные особенности суммарной диафоразной активности: чуть больше 50% составляли клетки степени «а», больше 30% клетки степени «в». В связи с этим можно сделать вывод о том, что часть нейтрофилов как бы компенсировала недостающие функциональные звенья.

В моноцитах наблюдалась сходная картина диафоразной активности.

В нейтрофилах при поступлении качественная реакция на суммарную эстеразную активность выражалась реакцией высшей степени «в». При стандартной терапии доксициклином были выявлены нейтрофилы не только «в», но и «б» степени. Применение циклоферона в комплексе с доксициклином позволило приблизить суммарную эстеразную активность к контрольным значениям. Использование только циклоферона не дало желаемого лечебного эффекта. Кроме того, появились нейтрофилы группы «в». Наилучший результат получен при лечении циклофероном с доксициклином.

В моноцитах наблюдалась следующая картина: ближе всего к контрольным значениям была активность эстераз при лечении циклофероном с доксициклином.

Таким образом, терапия, проводимая во II группе, позволяла нормализовать активность

все исследованных групп ферментов. Использование только циклоферона не позволяло достигнуть нормализации активности изученных ферментных систем, даже увеличивало активность НАДФ-диафораз.

У больных II группы наблюдали нормализацию всего исследуемого ферментативного спектра моноцитов, кроме НАДФ-диафоразы.

В период проведения исследования нежелательные реакции отмечены в 2,5% случаев (9 человек). Из 246 больных, получавших, таблетированную форму циклоферона, у 5 (2,03%) выявлены нежелательные побочные реакции (НПР), в основном это были аллергические реакции, которые купировались назначением антигистаминных препаратов. В 4 (3,4%) случаях выявлены нежелательные реакции у пациентов, получавших доксициклин: головокружение, снижение аппетита, головная боль, аллергическая реакция. НПР отмечались, преимущественно, на 1–2 сутки приёма препарата, их длительность не превышала в среднем 1,7 дня, отмены препаратов не потребовалось ни в одном случае. Все НПР были лёгкой степени и оценивались в 1–1,5 балла и только у 1 больного в 2 балла. Зарегистрированные аллергические реакции в виде сыпи, вероятнее всего связаны с пищевыми аллергенами.

Выводы

1. Применение в комплексной терапии АРЛ индуктора интерферонов — циклоферона приводит к уменьшению длительности клинических симптомов: лихорадки, слабости, головной боли, миалгии, артралгии, тахикардии, гипотонии и гепатомегалии, способствует более раннему разрешению сыпи, сокращает сроки пребывания больных в стационаре, по сравнению со стандартной терапией.

2. Включение циклоферона приводит к восстановлению сниженной ферментативной активности фагоцитов (нейтрофилов и моноцитов) у больных АРЛ, что способствует к нормализации активности дегидрогеназ, диафораз, приближает к норме активность эстераз.

3. Восстановление до нормальных значений сниженного содержания α -ИФН и увеличенного γ -ИФН, увеличение содержания иммуноглобулинов G и A приводит к нормализации гуморального иммунитета (В-лимфоциты).

4. Сочетанное применение циклоферона и стандартной терапии, а также монотерапия циклофероном приводила к нормализации показателей фагоцитоза.

фекций в свете выполнения «Основных направлений развития охраны здоровья населения СССР». Тез докл обл науч-практ конф. Астрахань. 1989; 57–58.

3. Галимзянов Х. М. Астраханская риккетсиозная лихорадка (клиника, диагностика, лечение): Дисс. докт. мед. наук. Астрахань. 1997; 338.

4. Галимзянов Х. М., Малеев В. В., Тарасевич Н. В. Астраханская риккетсиозная лихорадка. Астрахань. 1999; 151.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобан К. М. Важнейшие риккетсиозы человека. Ленинград. 1980; 375.
2. Андросова С. В., Нежнева В. Н., Рогаткин А. К. и др. К вопросу о расшифровке заболеваний неясной этиологии в Астраханской области. Итоги и перспективы профилактики особо опасных ин-

5. Алымов А. Я. Марсельская сыпная лихорадка. Совр мед 1989; 13: 30—33.
6. Uchiyama T., Zhao L., Yan Y., Uchida T. Cross-reactivity of *Rickettsia japonica* and *Rickettsia typhi* demonstrated by immunofluorescence and Western immunoblotting. Microbiol Immunol 1995; 39: 12: 951—957.
7. Ковтунов А. И. Салько В. Н., Седова А. Г. и др. Сб науч трудов «Вопросы риккетсиологии и вирусологии». Астрахань — Москва, 1996; 13—15.
8. Покровский В. И. Заболеваемость инфекционными болезнями в России. Практ врач. 1995; 2: 4—5.
9. Галимзянов Х. М., Рассказов Н. И., Алтухов С. А., Медведев Н. П. Сб науч трудов «Вопросы риккетсиологии и вирусологии». Астрахань — Москва, 1996; 27—30.
10. Гришанова А. П., Сулаянц Н. Н., Инкина Т. Е. и др. Вopr риккетсиол вирусол 1996; 42: 45.
11. Тарасов В. В. Экологические подходы к изучению природно-очаговых болезней. Мед паразитол паразитар бол 1990; 3: 73—78
12. Hackstadt T. The biology of rickettsiae. Infect Agents Dis 1996; 53: 127—143.
13. Heymann W. R. Rickettsial microbiology. Clin Dermatol 1996; 143: 243—244.
14. Quintal D. Historical aspects of the rickettsioses. Ibid 1996; 143: 237—242.
15. Малеев В. В. Особенности клиники и лечения Астраханской риккетсиозной лихорадки. Эпидемиология. Клиника, диагностика, лечение и профилактика важнейших инфекционных болезней. Мат конф. Тамбов — Астрахань. 1994; 110—111.
16. Алтухов С. А. Характеристика кожных проявлений Астраханской лихорадки: автореферат дисс. канд. мед. наук. Астрахань, 1995; 20.
17. Steine-Martin E. A. An historical review of toxic and reactive morphologic alteration in granulocytes and monocytes. Amer J Technol 1982; 6: 491—505.
18. Сажнев С. В., Малеев В. В., Касимова Н. Б. и др. Сб. научных трудов «Вопросы риккетсиологии и вирусологии». Астрахань — Москва, 1996; 40—42.
19. Сажнев С. В., Малеев В. В., Касимова Н. Б. и др. Там же. Астрахань — Москва, 1996; 45—47.
20. Walker D., Matten W. Rickettsial vasculitis. Am Heart J 1980; 100: 896—906.
21. Тотолян А. А., Фрейдлин И. С. Клетки иммунной системы. Санкт-Петербург. 2000; 206.
22. Фрейдлин И. С. Иммунная система и её дефекты. СПб.: 1998; 110.
23. Хейхой Ф. Р. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: 1983; 368.
24. Человеческий лейкоцитарный альфа-интерферон. Нил по разработке и развитию препаратов из крови. Будапешт, Венгрия. 1985.
25. Касимова Н. Б. Клинико-патогенетические и иммуногенетические аспекты Астраханской риккетсиозной лихорадки: Автореф... докт. дисс. М.: 2004; 44.
26. Mancini G., Carbonara A., Heremans I. Immunochemical diantitation of antitation of antigens by single radial immunodiffusion. J Immunochem 1965; 2: 235—254.

Вопросы реабилитации и профилактики нежелательных явлений у больных, страдающих раком молочной железы и получающих антиэстрогенную терапию

С. В. СТРАЖЕВ¹, П. В. КОПОСОВ², А. В. БЕЛОНОВ³

¹ Онкологический диспансер № 3, Москва

² Городская поликлиника № 205, Москва

³ Городская поликлиника № 58, Москва

Problems of Rehabilitation and Prophylaxis of Adverse Reactions to Antiestrogen Therapy in Patients with Breast Cancer

S. V. STRAZHEV, P. V. KOPOSOV, A. V. BELONOGOV

Oncologic Dispensary No. 3, Moscow

Municipal Polyclinic No. 205, Moscow

Municipal Polyclinic No. 58, Moscow

Описаны принципы проведения специфических реабилитационных мероприятий у пациенток, страдающих гормоночувствительным раком молочной железы, в зависимости от вида антиэстрогенной гормонотерапии. С учётом различного механизма действия блокаторов антиэстрогенного воздействия — блокирования рецепторов эстрогенов, ингибирование ароматазы препаратами стероидного и нестероидного класса — разработаны программы реабилитации в зависимости от различного спектра побочных явлений антиэстрогенной терапии.

Ключевые слова: специфическая реабилитация, рак молочной железы, антиэстрогенные препараты.

The principles of specific rehabilitation in females with hormone sensitive breast cancer depending on the type of the antiestrogen hormonotherapy are described. According to the different mechanisms of action of the antiestrogen blockers impact (blocking of estrogen receptors, steroid and nonsteroid aromatase inhibition) programs for rehabilitation depending on the different spectra of antiestrogen therapy side effects were designed.

Key words: specific rehabilitation, breast cancer, antiestrogens.

Стандартом лечения гормонально-зависимого рака молочной железы (РМЖ) как в адъювантном режиме, так и при самостоятельном лечении распространённых форм стало использование гормонотерапии. Этот вид лечения за последние 40 лет эволюционировал и требует определённых клинических навыков как по его применению, так и при профилактике различного вида осложнений [1–14].

Наиболее важными антиэстрогенными препаратами в настоящее время являются:

- ингибиторы эстрогеновых рецепторов — тамоксифен цитрат, фульвестрант (Фазлодекс®);
- селективные нестероидные ингибиторы ароматазы — анастрозол (Аримидекс®), летрозол (Фемара®);
- стероидные ингибиторы ароматазы — экземестан (Аромазин®);

— прогестины — медроксипрогестерона ацетат (Провера®, Депо-Провера®), мегестрола ацетат (Мегейс®).

В последнее десятилетие мы становимся свидетелями того, что подходы к эндокринной терапии РМЖ изменяются кардинально, акцент делается на применение ингибиторов ароматазы [15–20], что требует разработки научно обоснованных специфических профилактических и реабилитационных мероприятий по коррекции побочных эффектов новой группы препаратов. Огромного внимания заслуживают последствия снижения уровня эстрогенов в организме в течение длительного времени. После того как появилось несколько сообщений о повышенной частоте кардиологических заболеваний и смертей при использовании селективных ингибиторов ароматазы по сравнению с использованием тамоксифена [14, 21–23], особое внимание во многих исследованиях стало уделяться кардиологической безопасности применения антиэстрогенной гормонотерапии.

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул. 3а. Редакция журнала

Механизм действия тамоксифена состоит из двух составляющих [1, 9, 10, 24]. К первой относится конкурентное блокирование эстрогеновыми рецепторами (ЭР), что позволяет получить эффект у 50—70% пациенток с положительными ЭР. На наличии ЭР в опухоли построено прогнозирование ответа на эндокринную терапию клеток рака молочной железы. Вторым механизмом действия тамоксифена является влияние на факторы роста опухоли (трансформирующий фактор роста — альфа, бета, инсулиноподобный фактор роста-1), а также возможность препарата ускорять апоптоз эстрогензависимых пролиферирующих клеток и снижать метастазирующий потенциал опухоли путём замедления неоангиогенеза.

Факторы роста влияют на клетки, вступившие в клеточный цикл деления. Для их перехода из G0 в следующую фазу клеточного цикла необходимо присутствие следующих факторов: тромбоцитарного фактора роста и фактора роста фибробластов. Продвижение компетентной клетки через G1-фазу (длительность которой лимитирует скорость пролиферации клеток) происходит под влиянием факторов прогрессии: инсулиноподобного и эпидермального, а также трансформирующего факторов роста. Следовательно, развитие клетки происходит при синергическом действии факторов роста в определенной последовательности и сочетании. Предполагается, что действие тамоксифена на клетки, развивающиеся под влиянием факторов роста, происходит через рецепторы эстрогена.

Лечебное действие тамоксифена при раке молочной железы является доказанным фактом [9, 10, 24, 25]. Однако препарат влияет также и на другие параметры и функции организма, что было показано в экспериментах на животных и при обследовании людей, принимающих тамоксифен [2]. Во-первых, следует отметить влияние тамоксифена на минеральную плотность костной ткани. Согласно полученным результатам, в группе больных, получавших плацебо, наблюдалось большее снижение плотности костной ткани по сравнению с группой больных, получавших тамоксифен в постменопаузе. Следует отметить, что у женщин репродуктивного возраста тамоксифен вызывает значительное снижение минеральной плотности костной ткани. Механизм развития данного эффекта основан на антиэстрогенном действии тамоксифена. В связи с этим представляется необходимым продолжать наблюдение за состоянием костной ткани у женщин в репродуктивном и постменопаузальном возрасте при продолжительном приёме тамоксифена [21, 26].

Во-вторых, при приёме тамоксифена происходит снижение уровня холестерина в сыворотке крови на 15% и снижение уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [26—28]. Эти данные были подтверждены в ходе 9 клинических иссле-

дований. Уровень холестерина и ЛПНП снижался у женщин как в пременопаузе, так и в постменопаузе. Наблюдалось снижение заболеваемости сердечно-сосудистой системы, а также снижение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. В исследованиях, проводившихся в Шотландии и Швеции, получены документально подтверждённые данные о значительном снижении смертности от сердечно-сосудистых заболеваний среди больных, принимавших тамоксифен [25, 29]. Тем не менее изучение этого вопроса продолжается, так как влияние тамоксифена на уровень холестерина ещё всесторонне не изучено.

Наряду с положительными вторичными эффектами тамоксифена существуют данные об отрицательном влиянии на организм животных и человека. Так, в эксперименте было установлено, что тамоксифен обладает канцерогенным действием, вызывая развитие рака печени у крыс, что связано с образованием олигонуклеотидов. Образование «обрывочных» нуклеотидов возможно и в гепатоцитах человека, но разница в том, что в организме человека и крысы имеются большие различия в процессах метаболизма и детоксикации: в организме человека эти процессы протекают более интенсивно, и в результате таких различий вероятность развития рака печени у человека ничтожно мала. У женщин, получающих тамоксифен, не было зарегистрировано ни одного случая развития рака печени. Проведённые исследования показывают [12], что при приёме стандартной дозы тамоксифена 20 мг/сут не увеличивается заболеваемость раком у пациенток, получающих адъювантную гормонотерапию тамоксифеном в течение 10 лет. При более высокой дозе приёма — 40 мг/сут отмечалось увеличение случаев развития рака ЖКТ. По результатам пилотного исследования, было отмечено 15 случаев появления злокачественных опухолей, не относящихся к раку молочной железы и раку эндометрия, однако статистически значимых различий в группе пациенток, принимавших тамоксифен, и в группе пациенток, принимавших плацебо, не было.

Документально подтверждено влияние тамоксифена на эндометрий. Впервые эти данные появились в Швеции, где при приёме тамоксифена в суточной дозе 40 мг отмечалось увеличение случаев развития рака эндометрия у женщин в постменопаузе в 6 раз. При ретроспективном анализе канцерогенного эффекта тамоксифена у женщин в постменопаузе, принимавших его в суточной дозе 20 мг в течение 2—5 лет, оказалось, что риск развития рака эндометрия увеличивался в 2 раза. Имеются сведения о том, что тамоксифен вызывает изменения эндометрия доброкачественного характера, которые могут проявляться в виде гиперплазии, полипов, а также появления кист и миом. Такие изменения отмечаются у 30% женщин, принимавших тамокси-

фен, однако они не свидетельствуют о повышении частоты рака эндометрия, но появление этих гинекологических осложнений может повлечь за собой развитие клинической симптоматики и увеличение числа гистерэктомии у таких пациенток [30—32].

Практически во всех исследованиях, целью проведения которых было выявить частоту возникновения рака эндометрия у пациенток, принимающих тамоксифен, были получены данные о том, что приём тамоксифена не увеличивает частоту развития рака эндометрия. Довольно показательным в этом смысле является пилотное исследование, проведённое Powles и Ashley в 1994 г. [29]. У 40% женщин, участвовавших в этом исследовании, отмечалось утолщение эндометрия (более 8 мм). Эти изменения диагностировались при помощи УЗИ трансвагинальным датчиком. При сравнении с группой, принимавшей плацебо, такое утолщение отмечалось только у 5% женщин. Утолщение эндометрия классифицировалось как гиперплазия, индуцированная тамоксифеном, которая может стать атипической, что повышает риск развития рака. Однако при сравнении результатов, полученных в группе тамоксифена и в группе плацебо, оказалось, что рак эндометрия развился только у 5 женщин в обеих группах. Статистические различия по риску развития рака эндометрия незначительны, что позволяет сделать вывод об отсутствии серьёзного повышения частоты развития рака этой локализации при продолжительном лечении тамоксифеном. Единственно разумный вывод, который можно сделать по данным исследований, изучающих развитие рака эндометрия на фоне приёма тамоксифена — это вердикт шотландских ученых: «не доказано» [12].

При приёме тамоксифена возможно повышение уровня азота мочевины, увеличение активности щелочной фосфатазы, повышение уровня билирубина, креатинина, развитие тромбоцитопении и лейкопении, а также тромбообразований. Необходимо научиться бороться с этими явлениями, наметив пути специфической профилактики. В настоящее время имеются сообщения о множестве лечебных средств, однако единой тактики лечения не существует. Заканчивая тему побочных эффектов тамоксифена, хочется еще раз подчеркнуть, что по сравнению с другими противоопухолевыми препаратами он обладает наименьшим количеством побочных реакций и довольно хорошо переносится практически всеми больными.

В последнее десятилетие в арсенале онкологов появились нестероидные ингибиторы ароматазы, все чаще используемые как для адъювантной гормонотерапии, так и для самостоятельного лечения. К настоящему времени существует мнение, что использование нестероидных ингибиторов ароматазы более эффективно, чем тамоксифена, а спектр их безопасности значительно уже [14, 28, 31, 33—40].

Двойное-слепое рандомизированное исследование BIG 1-98 (The Breast International Group 1-98, Международная группа по изучению рака молочной железы) III фазы проведено для сравнения эффективности тамоксифена и летрозолола в качестве препаратов для инициального адъювантного лечения инвазивного операбельного РМЖ, имеющего эстрогенные и/или прогестероновые рецепторы, у женщин в постменопаузе [13, 36, 39, 41—43]. Исследование проведено на популяции из 8010 женщин. Рандомизация проводилась по 4 возможным схемам адъювантного лечения:

- монотерапия летрозолом в течение 5 лет;
- монотерапия тамоксифеном в течение 5 лет;
- летрозол в течение 2 лет, затем тамоксифен в течение 3 лет;
- тамоксифен в течение 2 лет, затем летрозол в течение 3 лет.

Две группы инициального приёма летрозолола сравнивали с двумя группами инициального приёма тамоксифена. Помимо названных препаратов, влияющих на гормональный статус, приблизительно четверть больных получали другие виды лекарственного противоопухолевого лечения. Лучевая терапия проведена более чем у 70% больных. Главным критерием для сравнения эффективности лечения считалась бессобытийная выживаемость. Её определяли на основании времени, прожитого больной без следующих событий: рецидив (местный, регионарный, в виде отдалённых метастазов), новый инвазивный рак в противоположной молочной железе, любой второй рак в другом органе (не в молочной железе), смерть без «событий», связанных с раком. В качестве второстепенных критериев выступали: общая выживаемость, выживаемость без системного РМЖ, частота второго рака другого органа (не молочной железы); показатели безопасности лечения. Медиана наблюдения составила 25,8 месяцев. Результаты лечения приведены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты лечения по данным исследования BIG 1-98

Критерий сравнения	Объединённая группа больных, получавших летрозолола, %	Объединённая группа больных, получавших тамоксифен, %
5-летняя безрецидивная выживаемость	84,0	81,4
Бессобытийная выживаемость (за время наблюдения)	91,2	89,3
Общая выживаемость (за время наблюдения)	95,9	95,2
Выживаемость без системного РМЖ (за время наблюдения)	91,9	90,4

Таблица 2. Частота отдельных осложнений в исследовании BIG 1-98

Осложнение	Объединённая группа больных, получавших летрозол, %	Объединённая группа больных, получавших тамоксифен, %
Переломы	5,7	4,0
Тромбоэмболии	1,5	3,5
Кровотечения из половых путей	3,3	6,6
Гиперхолестеринемия во время лечения	43,6	19,2
Тяжёлые кардиальные осложнения	2,1	1,1

Таблица 3. Серьёзные нежелательные явления в период лечения и после лечения до рецидива в популяции оценки безопасности (частота случаев в год)

Показатель	Во время лечения		После лечения	
	анастрозол	тамоксифен	анастрозол	тамоксифен
Период наблюдения (человеко-лет)	12781	12331	9351	9448
Все серьёзные нежелательные явления	1054 (8,25)	1125 (9,12)	356 (3,81)	339 (3,59)
Рак эндометрия	4 (0,03)	12 (0,10)	1 (0,01)	12 (0,13)
Инфаркт миокарда	34 (0,27)	33 (0,27)	26 (0,4)	28 (0,30)
Инсульт	20 (0,16)	34 (0,28)	22 (0,24)	20 (0,21)
Эпизоды переломов	357 (2,93)	234 (1,90)	146 (1,56)	143 (1,51)

Примечание. В скобках — %.

Вероятность наступления события оказалась достоверно ниже в группе летрозола (отношение риска 0,81). Преимущество группы летрозола особенно было выражено в сниженной частоте отдалённых метастазов (отношение риска 0,73). При этом указанные две группы достоверно не различались по кумулятивной частоте рака другого органа (не молочной железы). Кумулятивная частота смерти без предшествующих событий, связанных с раком, была несколько выше в группе летрозола (1,4% через 3 года после рандомизации) в сравнении с группой тамоксифена (0,9%), но это различие не было статистически значимым. Общая выживаемость была немного выше в группе летрозола, но это различие также не являлось статистически значимым. Общая частота угрожающих жизни или фатальных осложнений лечения была одинаковой в обеих объединённых группах (по 1,7%). Однако наблюдались достоверные отличия по частоте следующих осложнений, представленных в табл. 2.

Кроме того, в группе тамоксифена достоверно чаще встречались приливы жара и потливость, а в группе летрозола — артралгия различной степени выраженности. Болеестораживающим показателем является частота случаев смерти, не связанных с осложнением рака. В группе тамоксифена, по сравнению с группой Фемары® (летрозол), было больше случаев смерти (192 против 166), а также больше случаев смерти, связанных с опухолью (154 против 111 соответственно). Между тем необходимо обратить внимание на то, что частота случаев смерти, которым не предшествовало событие, связанное с опухолью, была выше в группе Фемары® (1,4%, $n=55$), чем в группе тамоксифена (0,9%, $n=38$, $p=0,077$). Из этих смертей в группе Фемары® было 7 случаев и один в

группе тамоксифена, имевших цереброваскулярный генез. Непосредственная причина смерти была сердечно-сосудистой у 13 пациентов в группе Фемары® и у 6 пациентов в группе тамоксифена. Не было обнаружено различий в смертности сердечно-сосудистого генеза неустановленной этиологии (10 случаев смерти в каждой группе) или от венозного тромбоза (2 случая смерти в каждой группе). Частота нежелательных явлений со стороны сердца была несколько ниже в группе тамоксифена. Среди 3975 пациенток, леченных Фемарой®, частота таких нежелательных явлений составила 4,1 против 3,8% среди 3988 пациенток, которые получали тамоксифен. Вместе с тем в группе тамоксифена частота тромбоэмболии (2,1%) была значимо выше, чем в группе Фемары (0,8%) ($p<0,0001$). И наоборот, в группе Фемары было больше сердечных нежелательных явлений III–IV степени тяжести, чем в группе тамоксифена: 2,1 против 1,1% соответственно ($p=0,0003$). В исследовании BIG-I-98 [42] рецидивы отдалённых метастазов, а также случаи смерти сердечного/цереброваскулярного генеза возникали довольно рано.

Следует отметить, однако, что аналогичная тенденция наблюдалась в исследовании АТАС (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) [23, 44, 45], в котором изучали лечение другим ингибитором ароматазы — Аримидексом® (анастрозол) как на фоне монотерапии или в комбинации с тамоксифеном (табл. 3).

По сравнению с терапией тамоксифеном, лечение ингибиторами ароматазы сопровождается меньшим риском тромбоэмболических осложнений, однако есть некоторые свидетельства того, что при лечении этими препаратами может повышаться риск сердечно-сосудистых осложнений.

Необходимо уделять больше внимания этому вопросу и дать более чёткий ответ на него. В настоящее время нет информации, которая позволила бы определить, является ли указанная тенденция долгосрочной, и, кроме того, пока не представляется возможным сопоставить конкретные ингибиторы ароматазы по степени связанного с ними сердечно-сосудистого риска. Остается лишь подтвердить наличие определённых свидетельств того, что с каждым из этих препаратов могут быть связаны различные сердечно-сосудистые осложнения.

Различие между частотой сердечно-сосудистых осложнений у пациенток возможно обусловлено протективным эффектом тамоксифена, а не негативным влиянием Фемары. Другие крупные исследования продемонстрировали снижение уровня липидов и уменьшение частоты сердечно-сосудистых осложнений среди женщин, леченных тамоксифеном, тогда как в исследовании MA-17, касавшемся сравнения Фемары® и плацебо, между двумя лечебными группами не было обнаружено различия в уровнях липидов [46]. Таким образом, то, что мы наблюдаем в клинических исследованиях, касающихся сравнения ингибиторов ароматазы и тамоксифена, может представлять собой протективный эффект последнего.

Обнаруженное в исследовании BIG-I-98 [42] 14% улучшение общей выживаемости не является статистически достоверным, однако подгрупповой анализ выявил интересные и потенциально полезные тенденции в плане общей выживаемости и безрецидивной выживаемости. Например, отношение рисков безрецидивной выживаемости у женщин, которые ранее получали химиотерапию, было лучше, чем у женщин, не получавших химиотерапию (0,70 против 0,85). Кроме того, пациентки с вовлечением лимфатических узлов лучше отвечали на лечение, чем пациентки с интактными лимфатическими узлами (ОР 0,71 и 0,99 соответственно). Наконец, отмечено небольшое и статистически недостоверное увеличение безрецидивной выживаемости у пациентов с опухолями, позитивными по рецепторам к эстрогенам и прогестерону, по сравнению с женщинами, у которых опухоли не имели рецепторов к прогестерону. Как и ожидалось, у женщин, получавших тамоксифен, частота тромбозов, ночной потливости и влажностных кровотечений. Гистологическое исследование эндометрия потребовалось у 72 женщин в группе Фемары® и у 288 женщин в группе тамоксифена.

На конференции ASCO (2005) [23, 41] были также впервые представлены данные о частоте болей в костях и суставах и о частоте патологиче-

ских изменений эндометрия у пациенток, леченных Фемарой®. Известно, что ингибиторы ароматазы снижают минеральную плотность костной ткани, и настоящее исследование показало, что у женщин, получавших Фемару®, частота переломов костей была выше, чем у пациенток, получавших тамоксифен (5,7 против 4,0%). Это соответствует 2,2 переломов на 100 пациенток в год в группе Фемары® и 1,5 переломов на 100 пациенток в год в группе тамоксифена. Боль в суставах тоже чаще наблюдалась у пациенток, леченных Фемарой®, чем получавших тамоксифен: 20,3 и 12,3% соответственно. Лечебные группы отличались по частоте гиперхолестеринемии (43,5% в группе Фемары и 19,1% в группе тамоксифена) [32, 46]. Следует отметить, однако, что гиперхолестеринемия была выражена слабо (т. е. I или II степени). В любом случае риск гиперхолестеринемии был таким, что в соответствии с современными представлениями, рекомендуется регулярное определение липидного профиля у женщин, которых лечат Фемарой®. Несмотря на то что частота таких осложнений, как ишемия миокарда, была низкой (1 случай на 100 женщин), необходимо проведение дополнительных исследований для определения влияния терапии Фемарой® на частоту указанных осложнений.

В целом исследование BIG-I-98 продемонстрировало превосходящий эффект Фемары®, по сравнению с тамоксифеном, в отношении снижения риска рецидива РМЖ у женщин в постменопаузе. Помимо того, Фемара® значительно снизила риск развития отдалённых метастазов. В исследовании BIG-I-98 обнаружена более высокая частота переломов костей у женщин, леченных Фемарой®, однако другие исследования, представленные на конференции ASCO, показали, что снижение массы костной ткани, вызываемое противоопухолевой терапией, можно предотвратить с помощью бисфосфонатов, таких как золедроновая кислота [41]. Наконец, говоря о том, что частота сердечно-сосудистых осложнений у женщин, которых лечили Фемарой®, была выше, чем у получавших тамоксифен, следует отметить, что этот эффект, по всей видимости, присущ всему классу ингибиторов ароматазы и что в настоящее время проводятся исследования, направленные на выяснение причин данного феномена. В сравнении с лечением тамоксифеном применение летрозолола у женщин в постменопаузе с инвазивным операбельным РМЖ, имеющим эстрогенные и/или прогестероновые рецепторы, повышает безрецидивную выживаемость. Однако дальнейшего изучения заслуживает проблема повышенной частоты переломов костей и кардиальных осложнений у больных, принимавших летрозол, пути их профилактики и специфической реабилитации.

Дефицит эстрогенов способствует возникновению менопаузального остеопороза. Показано, что

анастрозол и летрозол усиливают костную резорбцию, но их применение не увеличивало частоту остеопороза. В исследовании [47] у большего числа женщин в группе летрозола, по сравнению с группой плацебо, впервые был диагностирован остеопороз во время этой терапии, и, кроме того, костные переломы возникли у несколько большего числа женщин в группе летрозола (3,6%), чем в группе плацебо (2,9%). Однако нужно отметить, что, вследствие досрочного прекращения нашего исследования, эти данные могут занижать долгосрочное влияние летрозола на костный метаболизм. В настоящее время исследуется эффективность добавления бисфосфонатов к лечению ингибиторами ароматазы. До получения результатов этих исследований мы рекомендуем, чтобы женщины, получающие длительную терапию летрозолом, принимали кальций и витамин D в соответствии с правилами профилактики остеопороза и чтобы у таких пациенток врачи осуществляли мониторинг минеральной плотности костной ткани.

В группе летрозола чаще наблюдались такие побочные эффекты, как приливы, артрит, артралгия и миалгия, которые, однако, были слабо выраженными. Лишь небольшая часть женщин отказалась от продолжения приёма летрозола из-за токсических эффектов. Последствия таких эффектов можно было бы более точно оценить путём анализа данных о качестве жизни пациенток, но из-за преждевременного прекращения исследования эти данные не представлены [42].

Рак эндометрия отчасти является эстроген-зависимым и может быть редким осложнением терапии тамоксифеном, которое иногда возникает даже после отмены этого препарата. В исследованиях частота вагинальных кровотечений была значимо ниже в группе летрозола, чем в группе плацебо. В связи с этим было бы интересно провести дополнительные исследования, чтобы установить, действительно ли летрозол снижает риск развития рака эндометрия. С другой стороны, не изучены последствия длительного воздействия ингибиторов ароматаз на минеральную плотность костной ткани и липидный спектр крови. Также неизвестна эффективность ингибиторов ароматаз у женщин в перименопаузе.

Аромазин® (экземестан) — стероидный ингибитор ароматазы (ИА), необратимо блокирующий конверсию андрогенов в эстрогены в тканях у женщин в менопаузе. Проведённые исследования продемонстрировали эффективность Аромазина® во 2-й линии терапии после прогрессирования РМЖ на фоне приёма тамоксифена, в 3-й линии (после тамоксифена и мегестрола ацетата) при прогрессировании РМЖ на фоне гормонотерапии нестероидными ингибиторами ароматазы [22, 27, 35, 47—49]. При разработке проекта протокола IES, сравнивавшего адъювантную гормо-

нотерапию тамоксифеном в течение пяти лет с назначением Аромазина (после двух-трех лет приёма тамоксифена) до пяти лет, исследователи основывались на теоретических предположениях, позволявших ожидать преимущества раннего перехода с тамоксифена на ИА. Адъювантная гормонотерапия тамоксифеном в течение двух лет увеличивала безрецидивную и общую выживаемость, причём при длительном наблюдении (более 10 лет) это преимущество сохранялось. Максимальный эффект адъювантного применения тамоксифена реализуется в течение первых двух лет. В этом случае логично переходить на ИА, так как их эффективность во 2-й линии лечения после тамоксифена доказана. Последовательное применение тамоксифена и ИА позволяет помимо всего прочего избежать развития рака эндометрия, отмечаемого при длительном приёме тамоксифена, и использовать позитивный эффект последнего на костный метаболизм и липидный профиль.

Е. Bria и соавт. [33] опубликовали анализ пяти адъювантных протоколов, в которых применялись ИА, такие как экземестан, анастрозол и аминоглютетемид, после двух-трех лет гормонотерапии тамоксифеном, включавших 8794 больных РМЖ. Отмечено статистически значимое преимущество перехода на ИА: риск любого нежелательного явления снижался на 3,8%, уменьшалось количество местных рецидивов и отдалённых метастазов, преимущество в общей выживаемости было достоверным и составило 1,2%. Назначение ИА также уменьшало количество случаев развития других онкологических заболеваний, кроме РМЖ, хотя причина этого не ясна.

В протоколе IES [35] женщины в постменопаузе, которым проводилось радикальное хирургическое лечение по поводу РМЖ, с позитивным или неустановленным рецепторным статусом опухоли. Затем пациентки получали адъювантную гормонотерапию тамоксифеном в течение двух-трех лет, после чего проводилась рандомизация двойным слепым методом с продолжением гормонотерапии Аромaziном® в дозе 25 мг/сут или тамоксифеном в дозе 20 мг/сут до пяти лет. В исследование были включены 4724 пациентки, из которых 2352 рандомизированы в группу Аромазина®, 2372 — в группу тамоксифена. Средний срок наблюдения составил 55,7 месяца.

В группе больных, получавших Аромазин®, отмечено повышение вероятности безрецидивной выживаемости на 24%, абсолютная разница между двумя группами в пользу Аромазина® по этому показателю составила 3,4% после пяти лет наблюдения (после 2,5 лет наблюдения — 3,2%, преимущество сохраняется после окончания лечения).

Лечение Аромaziном® способствовало также повышению продолжительности жизни на 15% в сравнении с тамоксифеном, абсолютная разница

составила 1,2% ($p=0,08$) после пяти лет наблюдения (после 2,5 лет наблюдения — 0,8%). При анализе в подгруппе с положительными/неизвестными рецепторами эстрогенов отмечено статистически значимое ($p=0,04$) уменьшение риска смерти на 17%. Кроме того, лечение Аромазином® снизило риск развития рака другой молочной железы на 44%, отдалённых метастазов — на 18%. Частота отказов от лечения, обусловленных побочными эффектами или нежеланием пациентки, была примерно одинаковой в обеих группах. Наиболее частыми побочными эффектами были приливы, утомляемость, головная боль (их частота в обеих группах была одинакова) и артралгии (чаще отмечались у пациенток, принимавших Аромазин®: 13 против 8%). С точки зрения профилактики и специфической реабилитации при гормонотерапии аромозином профиль сердечно-сосудистых осложнений в целом не различался по группам, тромбоэмболические осложнения чаще наблюдались у больных, продолжавших приём тамоксифена (3,1 против 1,9%; $p=0,01$). Осложнения гинекологического плана чаще встречались также в группе больных, продолжавших приём тамоксифена.

По данным доклинических исследований, а также отдельных клинических наблюдений [17, 26, 35], экземестан способствовал повышению плотности костной ткани, что было обусловлено стероидной структурой препарата и образованием слабого андрогенного метаболита 17-гидроэкземестана. Однако у больных, получавших Аромазин® в протоколе IES, остеопороз, переломы костей и костно-мышечные осложнения наблюдались чаще, чем у продолжавших приём тамоксифена. Исследование костных маркёров и плотности костной ткани продемонстрировало, что переход на приём Аромазина® сопровождается снижением плотности костной ткани преимущественно в течение первых 12 месяцев от начала применения препарата, что может быть обусловлено потерей протективного влияния тамоксифена, затем снижение плотности костной ткани замедляется. В то же время при ретроспективном сравнении с другими адъювантными протоколами, предусматривающими применение ИА, создается впечатление, что Аромазин® снижает плотность костной ткани в меньшей степени, чем анастрозол или летрозол [26]. Это подтверждено данными опубликованного ранее сравнительного исследования костных маркёров при применении различных ИА у добровольцев [46].

Таким образом, в группе больных, перешедших на приём Аромазина®, отмечено меньше смертей как от РМЖ, так и по другим причинам, реже развивались другие онкологические заболевания, в том числе рак матки, желудочно-кишечного тракта, лёгкого и пр.

У 55 больных РМЖ, 27 из которых получали тамоксифен, а 28 — Аромазин® после тамоксифена, G. Francini и соавт. [50] изучали влияние гормонотерапии на строение тела и липидный профиль. Обследование больных проводили перед рандомизацией, а также через 6 и 12 месяцев после таковой. При отсутствии изменений в калорийности пищи за время исследования у больных, перешедших на приём Аромазина®, отмечалось снижение жировой массы тела с повышением соотношения безжировой и жировой масс, а также уменьшение веса (у пациенток, продолжавших приём тамоксифена, вес оставался без изменения). В группе Аромазина® снижился уровень триглицеридов и липопротеидов высокой плотности, а уровень липопротеидов низкой плотности увеличился. Все выявленные различия были статистически значимы.

Применение Аромазина® (экземестана) в адъювантном режиме у больных РМЖ в менопаузе после двух-трехлетней гормонотерапии тамоксифеном позволило в сравнении с пятилетней монотерапией тамоксифеном повысить безрецидивную выживаемость, снизить количество местных рецидивов, отдалённых метастазов, уменьшить риск развития рака другой молочной железы. У больных, получавших Аромазин®, реже встречались тромбоэмболические явления и гинекологические осложнения. Следует учитывать, что при длительном применении Аромазина® и других ИА необходимы контроль плотности костной ткани и профилактика остеопороза. Хотя целесообразность назначения ИА в адъювантном лечении РМЖ очевидна, оптимальная последовательность применения тамоксифена и ИА будет определена после получения данных других проводящихся в настоящее время рандомизированных исследований.

Заключение

Суммируя вышеизложенное, следует подчеркнуть следующее. Применение гормонотерапии тамоксифеном и ингибиторами ароматазы стало неотъемлемой частью комплексного лечения рака молочной железы у женщин. В многочисленных исследованиях выявлено статистически незначимое различие между группой ИА и группой тамоксифена по показателям выживаемости, по частоте сердечно-сосудистых осложнений, нарушений минерального обмена, жирового обмена и связанной с ними гиперхолестеринемии. Последняя увеличивает число сердечно-сосудистых осложнений. Необходимо своевременно выявлять и корректировать побочные эффекты ингибиторов ароматаз, для чего нужно создавать методологические подходы для выявления этих грозных осложнений, разработать принципы и методы специфической реабилитации данной категории пациенток.

С этой целью необходимы катamnестические и проспективные исследования по мониторингу этих осложнений, более длительное наблюдение за пациентками, получающими ИА, чтобы исключить возможность того, что эти препараты вызывают негативные сердечно-сосудистые и прочие эффекты, осуществлять текущий монито-

ринг побочных эффектов у женщин, получающих ИА, провести исследования, устанавливающие влияние этих препаратов на качество жизни, липидный профиль, минеральный обмен, и разработать специфическую индивидуальную программу реабилитации указанных выше побочных эффектов ИА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Возный Э. К. Рак молочной железы. Фармацевт вестн 1998; 19: 10—11.
2. Горбунова В. А. Рак молочной железы: проблемы гормонотерапии. Новый мед журн 1998; 2: 7—11.
3. Моисеев В. М., Семглазов В. Ф., Тюлядин С. А. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы. СПб.: 1997.
4. Горбунова В. А. Новые гормональные препараты для лечения рака. Материалы конференции «Современные тенденции развития лекарственной терапии опухолей», организованная ОНЦ РАМН при содействии ESMO, 9—10 декабря 1997, М. 30—35.
5. Семглазов В. Ф. Стандарты лечения рака молочной железы (Сан-Галленб 2007). Совр онкол 2007; экстравыпуск: 3—7.
6. Семглазов В. Ф., Канаев С. В., Бугрова И. Л. и др. Оценка эффективности адъювантной системной терапии при выполнении органосохраняющего лечения рака молочной железы. Вopr онкол 1998; 4: 408—413.
7. Arteaga C., Koli K., Dugger T. et al. Reversal of tamoxifen resistance of human breast carcinomas *in vivo* by neutralizing antibodies to transforming growth factor-beta. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 46—53.
8. Bernstein L., Deapen D., Cerhan J. et al. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. Breast Diseases 200; 11: 213.
9. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. Lancet 1998; 352: 930—942.
10. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Lancet 1998; 351: 1451—1467.
11. Plourde P. V., Dyroff M., Dosett M. et al. Arimidex: a new oral, once-a-day aromatase inhibitor. J Steroid Biochem Molec Biol 1995; 53: 175—179.
12. Scottish Cancer Trials Office (MRC): Adjuvant tamoxifen in the management of operable breast cancer: the Scottish trial. Lancet 1987; 330: 171—175.
13. Winer E. P. et al. American Society of Clinical Oncology. Technology assessment of the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. Status Report 2002. J Clin Oncol 2002; 20: 3317—3327.
14. Yates R. A., Dowsett M., Fisher G. V. et al. Arimidex (ZD1033): a selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers. Br J Cancer 1996; 73: 543—548.
15. Baum M. Use of aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of breast cancer. Endocrine-Related Cancer 1999; 6: 231—234.
16. Carlini P. et al. Exemestane is an effective 3rd line hormonal therapy for postmenopausal metastatic breast cancer patients pretreated with 3rd generation nonsteroidal aromatase inhibitors. Ann Oncol 2002; 13: Suppl 5: 48, abstr. 171P.
17. Coombes R. C. et al. A randomized trial of exemestane after two or three years of tamoxifen therapy in postmenopausal woman with primary breast cancer. N Engl J Med 2004; 350: 1081—1092.
18. Goss P. E., Ingle J. N., Martino S. et al. Randomized trial of Letrozole following Tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1267—1271.
19. Hayward J. L., Carbone P. P., Heuson J.-C. et al. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. Cancer 1977; 39: 1289—1294.
20. Howell A., Defriend D., Robertson J. et al. Response to specific antiestrogen (ICI182, 780) in tamoxifen-resistant breast cancer. Lancet 1995; 345: 29—30.
21. Dowsett M., Pfister C., Johnston S. et al. Impact of tamoxifen on the pharmacokinetics and endocrine effects of the aromatase inhibitor letrozole in postmenopausal women with breast cancer. Breast Diseases 2000; 11: 212.
22. Lønning P. et al. Activity of Exemestane (Aromasin) in breast cancer after failure of nonsteroidal aromatase inhibitors: phase II trial. J Clin Oncol 2000; 18: 2234—2244.
23. The ATAC trialists' group. Results of the ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years adjuvant treatment for breast cancer. Lancet 2005; 365: 60—62.
24. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. Lancet 2005; 365: 1687—1717.
25. Lykkesfeldt A. Mechanisms of tamoxifen resistance in the treatment of advanced breast cancer. Acta Oncol 1996; 35: 9—14.
26. Banks L., Girgis S., Coleman R. et al. Skeletal effect of exemestane in patients with breast cancer. J Bone Miner Res. 2005; 20 Suppl 1: S. 327.
27. Jones S. et al. Multicenter, phase II trial of Exemestane as third-line hormonal therapy of postmenopausal women with metastatic breast cancer. J Clin Oncol 1999; 17: 3418—3425.
28. Walton P. L., Yates R. A., Dukes M. Arimidex: an overview of a new selective nonsteroidal aromatase inhibitor. In: Motta M, Serio M, eds. Sex Hormones and Antihormones in Endocrine Dependent Pathology: Basic Clinical Aspects. Proceedings of an International Symposium, Milano, 10—14 April 1994. Amsterdam, New York: Elsevier, 1994; 311—316.
29. Stewart H. J., for the Scottish Breast Group. Adjuvant tamoxifen duration in a randomized trial. Breast 1995; 4: 256.
30. Fisher B., Jeong J. H., Bryant J. et al. Treatment of lymph-node-negative estrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from national surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. Lancet 2004; 364: 858—868.
31. Fisher B., Digman J., Bryant J., Wolmark N. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer. Updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14: randomized trial. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 684—690.
32. Ingle J., Suman V., Johnson P. et al. Evaluation of tamoxifen plus letrozole with assesment of pharmacokinetic interaction in postmenopausal women. Breast Diseases 2000; 11: 210—211.
33. Bria E., Ciccarese M., Giannarelli D. et al. Early switch with aromatase inhibitors as adjuvant hormonal therapy for postmenopausal breast cancer: pooled-analysis of 8794 patients. Cancer Treat Rew 2006; 32: 325—32.
34. Budzar A., Jonat W., Howell A. et al. Anastrozole vs megestrol acetate in treatment of postmenopausal women with advanced breast carcinoma. Results of a survival update based on a combined analysis of data from two mature phase III trials. / Cancer 1998; 83 (8) 15th Sep: 1142—52.
35. Coombes R. C. et al. First mature survival analysis of the Intergroup Exemestane Study: a randomized trial in disease-free, postmenopausal patients with early breast cancer randomized to continue tamoxifen or switch to exemestane following an initial 2 to 3 years of adjuvant tamoxifen. Presented at: American Society of Clinical Oncologists (ASCO) Annual Meeting 2006.
36. Cuzick J., Howell A. Optimal timing of use of an aromatase inhibitor in the adjuvant treatment of postmenopausal hormone receptor-positive breast cancer. J Clin Oncol 2005; 23: 658.
37. Jonat W., Zoladex T. M. (Goserelin) vs. CMF as adjuvant therapy in premenopausal node-positive breast cancer: first efficacy results from ZEBRA Study. The Europ J of Cancer 2000; 36: Suppl 5: 67.
38. Kaufmann M. et al. Exemestane is superior to megestrol acetate following tamoxifen failure in postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III randomized double-blind trial. J Clin Oncol 2000; 18: 1399—1411.
39. Punglia R. S., Kuntz K. M., Winer E. P. et al. Optimizing adjuvant endocrine therapy in postmenopausal women with early-stage breast cancer: a decision analysis. J Clin Oncol 2005; 22: 5178—5187.

40. Robertson J. F. R., Lee D. Static disease (SD) of long duration (>24 weeks) is an important remission criteria in breast cancer patient treated with aromatase inhibitor «Arimidex» (anastrozole). *Breast Cancer Res and Treat* 1997; 46: 1 54: abstr. 214.
41. Brufsky A. et al. Zoledronic acid effectively inhibits cancer treatment-induced bone loss in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: 12-month BMD results of the Z-fast trial. Data presented at the 2005 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO). Orlando, FL, USA. Abstract 533.
42. The Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative group. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 2747—2757.
43. Wasan K. M. et al. The influence of letrozole on serum lipid concentrations in postmenopausal women with primary breast cancer who have completed 5 years of adjuvant tamoxifen. (NCIC CTG MA. 17L). *Ann Oncol* 2005; 16: 707—715.
44. ATAC trialists' Group. Эффективность адъювантной терапии анастрозолом и тамоксифеном у пациенток с ранними стадиями рака молочной железы: анализ данных исследования ATAC при медиане времени наблюдения 100 мес. (перевод с англ.). *Lancet Oncol.*, 2008; 9: 45—53.
45. Geiser J., Bernstein H., Ottestad L. et al. Neoadjuvant treatment with anastrozole ('Arimidex') causes profound suppression of intra-tumor estrogen levels. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 1999, 18 pp 82a Abs 311. 35th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, Atlanta, 15—18 May 1999.
46. Subar M. et al. Effects of steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors on markers of bone turnover and lipid metabolism in healthy volunteers. *Proc ASCO* 2004, abstr. 8038.
47. Gelmon K. A., Pritchard K. I. Evaluating the impact of new data from aromatase inhibitor trials on clinical practice in early breast cancer: a Canadian thought leader perspective from drs. Karen Gelmon and Kathleen Pritchard. *Medscape Hematology-Oncology* 2006; 8: 2.
48. Paridaens R. et al. Mature results of a randomized phase II multicenter study of Exemestan versus Tamoxifen as first-line hormonal therapy for postmenopausal women with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 1391—1398.
49. Paridaens R. et al. First line hormonal treatment for metastatic breast cancer with exemestane or tamoxifen in postmenopausal patients — A randomized phase III trial of the EORTC Breast Group. *Proc ASCO* 2004, abstr. 515.
50. Francini G., Petrioli R., Montagnani A. et al. Exemestane after tamoxifen as adjuvant hormonal therapy in postmenopausal women with breast cancer: effects on body composition and lipids. *Br J Cancer* 2006; 95: 153—158.

Качественные доклинические исследования — необходимый этап разработки и внедрения в клиническую практику новых лекарственных препаратов

А. Н. ВАСИЛЬЕВ

ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Центр экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, Москва

Good Preclinical Study, as an Obligatory Stage in Design and Clinical Use of New Medicinal Preparations

A. N. VASILYEV

Centre Examination of Drugs, Centre for Examination and Control of Medical Preparations, Moscow

Доклинические исследования — это испытания, проводимые обычно в условиях *in vitro* и *in vivo* на животных, до начала клинических исследований лекарственных веществ у человека. Они играют ключевую роль в разработке лекарственных препаратов. В рамках доклинических исследований выявляются новые соединения, обладающие полезными для человека биофармацевтическими и фармакокинетическими свойствами. В дополнение к этому, они позволяют ускорить переход от открытия нового действующего вещества к его последующей разработке в рамках клинических исследований, а также снизить временные и материальные затраты на последние. В рамках процесса доклинической разработки лекарственного препарата выделяют три основных направления: изучение фармакологической активности действующего вещества; изучение фармакокинетических свойств действующего вещества и лекарственной формы; изучение токсикологических свойств действующего вещества. В статье приводятся современные требования к проведению доклинических исследований лекарственных препаратов с практическими примерами.

Ключевые слова: GLP — Надлежащая лабораторная практика, иммуномодулирующие препараты.

Preclinical studies are investigations, performed *in vitro* and *in vivo* (on animals) prior to clinical trials in men. They play the main role in design of medicinal preparations. Preclinical studies provide research of new compounds with useful biopharmaceutical and pharmacokinetic properties. In addition, they to make shorter the period between isolation of a novel active substance and its further development within the clinical trials, as well as to lower the time and materials expenditures for the clinical trials. There are three aspects of the preclinical study: investigation of the pharmacological activity of the main substance, investigation of the pharmacokinetic properties of the active substance and its medicinal preparation and investigation of the toxicological properties of the active substance. The requirements for preclinical studies on medicinal preparations and practical examples are presented.

Key words: Good Laboratory Practice (GLP), immunomodulators.

Введение

Доклинические исследования — это испытания, проводимые обычно на различных моделях в условиях *in vitro* и *in vivo*, до начала клинических исследований лекарственных веществ у человека. Они играют ключевую роль в разработке лекарственных препаратов. В рамках доклинических исследований выявляются новые соединения, обладающие полезными для человека биофармацевтическими и фармакокинетическими свойствами. В дополнение к этому, они позволяют ускорить переход от открытия

нового действующего вещества к его последующей разработке в рамках клинических исследований, а также снизить временные и материальные затраты на последние.

В процессе доклинической разработки лекарственного препарата выделяют три основных направления:

1. Изучение фармакологической активности действующего вещества.
2. Изучение фармакокинетических свойств действующего вещества и лекарственной формы.
3. Изучение токсикологических свойств действующего вещества.

Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекар-

© А. Н. Васильев, 2012

Адрес для корреспонденции: 123182, Москва, ул. Щукинская, д.6, корп. 1. НЦЭСМП

ственных препаратов для медицинского применения (ICH) является основной международной организацией, регламентирующей требования к проведению доклинических исследований [1]. Стандартизация требований позволяет снизить различие в подходах к проведению доклинических исследований [2]. Требования ICH конкретизируются, а по неурегулированным вопросам — дополняются, национальными ведомствами с сфере регулирования обращения лекарственных средств [3, 4]. Стандарты проведения доклинических исследований должны соответствовать Надлежащей лабораторной практике (GLP) [5].

Изучение фармакологической активности действующего вещества

В рамках изучения фармакологической активности (фармакодинамики) исследуются биохимические и физиологические эффекты действующего вещества на организм, микроорганизмы или паразиты в тканях и жидкостях или на поверхности тела и механизм действия, и взаимосвязь между концентрацией действующего вещества и его эффектами [6].

Изучение фармакологической активности должно включать следующие виды исследований: первичная фармакодинамика (включая, по возможности, сравнительные исследования с лекарственными средствами того же класса), вторичная фармакодинамика, фармакологическая безопасность и фармакодинамические лекарственные взаимодействия [7].

При этом исследования фармакологической безопасности проводятся, чтобы защитить субъектов клинических исследований и лиц, принимающих зарегистрированные лекарственные препараты, от потенциальных нежелательных реакций лекарственных средств, избегая, по возможности, ненужного использования животных и других ресурсов [8, 9]. Учитывая особую клиническую значимость, в рамках исследования фармакологической безопасности предусматривается изучение потенциала лекарственного средства замедлять реполяризацию желудочков (удлинять интервал QT) [10].

В непосредственной взаимосвязи с изучением фармакодинамических свойств лекарственного препарата изучают его фармакокинетические параметры.

Изучение фармакокинетических свойств действующего вещества и лекарственной формы

Фармакокинетика изучает механизмы абсорбции и распределения действующего вещества, время начала и длительность фармакологиче-

ских эффектов, химические изменения фармацевтической субстанции в организме и способы и пути экскреции её метаболитов [11].

В рамках изучения фармакокинетических свойств действующего вещества и лекарственной формы исследуют степень и скорость абсорбции, биоэквивалентность и (или) биодоступность; распределение, включая объём распределения, связь с белками плазмы, проникновение через плацентарный барьер; метаболизм, включая химическую структуру и содержание метаболитов в биологических образцах, степень пресистемного метаболизма, участие микросомальных ферментов печени, способность к их индукции или ингибированию; экскрецию, включая пути и степень экскреции и способность выделяться с грудным молоком; фармакокинетические лекарственные взаимодействия [7, 12]. Практическое изучение биодоступности иммунобиологических препаратов рассмотрим на примере известного отечественного препарата ВИФЕРОН® — интерферон человеческого рекомбинантный альфа-2b с антиоксидантами (витамины Е и С) при его введении ректально в виде суппозиторий и через катетер.

Методика проведения исследования, используемый препарат и дозы. Исследование выполнялось на кроликах породы Шиншилла. Использовались взрослые самки массой 2 кг и новорожденные кролики обоего пола массой 100 г. Препарат, содержащий рекомбинантный альфа-2b ИФН в дозе 150000 МЕ, токоферола ацетат, аскорбиновую кислоту и масло какао вводили однократно ректально и через катетер каждому животному. Забор крови осуществляли из ушной вены через 0,5 ч после введения, затем — каждый час в течение 8 ч. Содержание ИФН в плазме крови определяли биологическим методом. Определение специфической противовирусной активности проводят в планшетах типа «Costar» (США) на 1—2-суточном монослое культуры клеток — MDBK (перевиваемая линия клеток почек молодого бычка), или Vero (перевиваемая линия клеток почки зелёной мартишки), или СПЭВ (перевиваемая линия клеток почек эмбриона свиньи), используя индикаторный штамм вируса везикулярного стоматита (VSV) или энцефаломиокардита мышей (ЕМС). В качестве стандарта противовирусной активности используют Международный стандартный образец активности (WHO International Standard Interferon alpha 2b, NIBSC code: 95/566 (MCO), или Отраслевой стандартный образец активности интерферона (ОСО 42-28-369-03) (ОСО), или Стандартный образец предприятия (СО). Готовят последовательные десятикратные разведения испытуемых образцов и стандартного образца активности до кон-

центрации 50—500 Ед/мл (исходя из ожидаемой активности препарата). С помощью многоканальной пипетки раститровывают образцы интерферона и стандартных образцов активности.

Через 24 ч инкубации из планшетов удаляют разведения образцов и вносят рассчитанную дозу вируса-индикатора (100 ТЦД₅₀/0,1 мл) по 0,1 мл во все лунки, исключая контрольные.

Учёт результатов проводят при соответствии заражающей дозы вируса 100 ТЦД₅₀/0,1 мл и при отсутствии дегенерации клеточного монослоя в контрольных лунках. За титр образца или стандарта в данном опыте (ED₅₀) принимают величину, обратную разведению препарата, в котором 50% лунок с клеточной культурой оказалась защищённой от цитопатического действия вируса.

Основные полученные результаты. Как при ректальном, так и при введении через катетер фармакокинетические кривые изменения концентрации препарата ВИФЕРОН® в плазме крови не отличаются по своему аналитическому виду и формально описываются двухэкспоненциальной кривой. При этом время полувыведения препарата в обоих случаях не отличалось и составляло 50—100 мин. При ректальном введении препарата ВИФЕРОН® площадь под фармакокинетической кривой уменьшается примерно на 20% по сравнению с введением через катетер, клиренс — на 35%, время достижения максимальной концентрации возрастает на 4 мин. Максимальная концентрация препарата в крови при обоих путях введения сравнима.

Выводы. Ректальное введение препарата ВИФЕРОН® в суппозиториях не приводит к существенному изменению его фармакокинетических параметров по сравнению с введением через катетер. Это позволяет использовать ректальное введение в дальнейших исследованиях как наиболее удобное.

Изучение токсикологических свойств действующего вещества

Целью изучения доклинической безопасности является описание токсических эффектов в отношении органов-мишеней, дозозависимости, взаимосвязи с экспозицией и потенциальной обратимости таких эффектов [2].

В рамках токсикологических исследований предусмотрено изучение общетоксических свойств, местной переносимости, токсикокинетики, репродуктивной токсичности и генотоксичности, а в случае длительного применения лекарственного препарата — канцерогенности. В отдельных случаях также предусмотрено изучение фототоксичности, иммунотоксичности, токсичности на неполовозрелых животных и способности вызывать лекарственную зависимость [2].

Исследование острой токсичности

Исследования острой токсичности направлены на получение сведений о токсических эффектах в остром эксперименте при однократном или многократном введении фармацевтической субстанции в течение короткого промежутка времени (в течение 24 часов) [13]. Исследованием острой токсичности как фундаментальным требованием к безопасности начинаются любые доклинические исследования лекарственных средств. После подтверждения безопасности исследуемого препарата в остром эксперименте переходят к изучению безопасности при длительном (регулярном) применении лекарственного препарата.

Исследования хронической токсичности

Целью исследования хронической токсичности (токсичности при многократном введении лекарственного препарата) является описание токсикологического профиля исследуемого соединения при его многократном введении; оно включает в себя выявление потенциальных органов-мишеней, которые могут подвергнуться токсикологическому воздействию, установление взаимосвязи между экспозицией и ответом на нее, а также потенциальной обратимости токсических эффектов [14].

Требования к дизайну исследования, включая выбор лабораторных животных, диапазон доз, путь и частоту введения, должны основываться на доступных фармакодинамических, фармакокинетических и токсикологических данных, а также предполагаемом клиническом применении [14, 15]; длительность исследования хронической токсичности зависит от последующего способа применения лекарственного препарата в клинической практике [16]. Начальная доза в впервые проводимых клинических исследованиях должна базироваться как на фармакодинамических данных, так и на концентрации, при которой не наблюдается нежелательных явлений (NOAEL) [2].

Практическое изучение хронической токсичности иммунобиологических препаратов рассмотрим на примере препарата ВИФЕРОН®.

Исследование проведено на 10 кроликах-самцах первоначальной массой 2—2,5 кг. Препарат вводили внутриректально 2 раза в день по 1 свече с 12-часовым интервалом. Каждый суппозиторий содержал 4×10⁶ МЕ ИФН-α, 12,5 мг аскорбиновой кислоты и 2,5 мг токоферола ацетата.

Хроническое введение препарата не влияло на общее состояние и поведение животных. В течение всего срока наблюдения не было отмечено отличий между животными экспериментальной и контрольной групп.

Через 4 недели было отмечено снижение в периферической крови кроликов экспериментальной группы содержания эритроцитов и тромбоцитов, при этом уровень гемоглобина, содержание лейкоцитов и ретикулоцитов не изменилось. В течение всего срока наблюдения свертываемость крови животных обеих групп не отличалась. Также не было отмечено влияния препарата ВИФЕРОН® на биохимические показатели крови. Не было обнаружено различий в активности ферментов печени, уровне креатинина и мочевины в течение всего срока наблюдения. В конце наблюдения не было выявлено различий во влиянии сывороток кроликов двух групп в реакции бласттрансформации.

После эвтаназии при макроскопическом исследовании внутренних органов не было отмечено какого-либо токсического влияния препарата ВИФЕРОН®. Микроскопическому изучению подвергали печень, селезёнку, семенники, надпочечники, кишечник, лимфатические узлы. При микроскопии не было отмечено каких-либо изменений, которые можно было бы связать с токсическим воздействием изучаемого препарата.

Выводы. При хроническом введении препарата ВИФЕРОН® в дозе в 120 раз превышающей терапевтическую препарат не обладает токсическим действием.

Исследование местной переносимости

Целью изучения местной переносимости является установление влияния лекарственного препарата (фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ) на ткани и органы в месте его предполагаемого введения в клинической практике. При этом стратегия исследования должна быть построена так, чтобы отличить механическое воздействие или чистое физико-химическое действие от токсикологических и фармакодинамических эффектов исследуемого продукта [17].

В последние годы ввиду разработки новых методов доставки лекарственных препаратов в организм возросло внимание к проблеме местной переносимости. Исследования *in vitro* становятся интегральной частью программы доклинических исследований местной переносимости лекарственных препаратов для медицинского применения, поэтому в современных руководствах предпринимается попытка ограничения таких исследований на животных [18].

Изучение местно-раздражающего действия препарата ВИФЕРОН® в виде мази и геля проведено на лабораторных животных: кроликах породы Шиншилла, морских свинках, крысах линии Вистар и мышах.

Изучение кожно-раздражающего действия. Исследования проведены на кроликах и морских

свинках, группы по 10 животных. На боках симметрично выстригали шерсть. В день эксперимента на один из боков наносили мазь в дозе до 1 г/кг, а на другой — мазевую основу. Реакцию кожи оценивали через 1, 4, 24, 48 и 72 ч.

Для оценки реакции конъюнктивы препарат в дозе 50 мг вводили в конъюнктивальный мешок кролика. Другой глаз служил контролем.

Изучение кожно-резорбтивного действия. Исследования выполнены на кроликах. Мазь и гель наносили ежедневно на предварительно выстриженную боковую поверхность. Дозы — 30 и 300 мг/кг. Животным контрольной группы наносили мазевую основу.

Изучение сенсibilизирующего действия. Эксперименты проводили на мышах. Животных сенсibilизировали однократно подкожно эмульсией альфа2-ИФН в дозе 15000 МЕ/кг (эквивалентная доза). Разрешающую дозу вводили через 5 суток в подушечки задних лапок.

Основные полученные результаты. ВИФЕРОН®, мазь и ВИФЕРОН®, гель не обладают местным раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки при остром и хроническом введении. При изучении морфологического состава крови не было обнаружено различий между животными двух групп. Морфопсия также не выявила особенностей у животных, получавших ВИФЕРОН®. Не выявлено аллергогенного действия препарата ВИФЕРОН® в виде мази и геля.

Исследование генотоксичности

Исследование влияния лекарственного препарата на его способность повреждать ДНК и её репарацию — генотоксичность — является важным аспектом разработки низкомолекулярных лекарственных препаратов.

Первые международные стандарты по проведению исследования генотоксичности были приняты в 1995 г. [19, 20]. С целью оптимизации стандартного набора исследований по выявлению генотоксичности для выявления потенциальных угроз благополучию человека и обеспечению единого руководства по интерпретации их результатов, конечной целью которого является улучшение профиля безопасности по канцерогенному эффекту, возникающему вследствие повреждения генетического материала, в 2011 г. ИСН утвердило новые рекомендации — «Руководство по исследованию генотоксичности и интерпретации данных о лекарственных препаратах для медицинского применения» [21].

В дополнение к этим требованиям на сегодняшний день также разработаны международные требования к примесям, которые могут содержаться в новых действующих веществах и потенциально обладать генотоксичностью [22].

Ввиду особой значимости и генотоксическом потенциале отдельно регламентируются требования к исследованию генотоксичности отдельных химических классов: антисмысловых олигонуклеотидов [23] и иногда индивидуальных веществ [24].

Результаты исследования генотоксичности рассматриваются совместно с данными, полученными в ходе изучения канцерогенности.

Исследование канцерогенности

Целью исследования канцерогенности является выявление онкогенного потенциала на животных и оценить соответствующий риск для человека. Любые опасения, возникшие в ходе лабораторной разработки, токсикологических исследованиях на животных и данных о применении у человека должны влечь за собой изучение канцерогенного потенциала [25]. В связи с чем для лекарственных препаратов были разработаны требования, предъявляемые к проведению таких исследований [26, 27], при этом в силу различий в свойствах и особенностях применения отдельных лекарственных препаратов также регламентируются выбор исследуемой дозы с целью выявления потенциальной канцерогенности [28].

В свете последних достижений биотехнологии и генной инженерии в токсикологических исследованиях всё чаще используются генетически модифицированные организмы, поэтому с целью единого подхода к изучению канцерогенности на трансгенных и других модифицированных животных были разработаны соответствующие рекомендации [29]. В силу высокой клинической и социальной значимости также подготовлены рекомендации к изучению канцерогенности в доклинических исследованиях аналогов инсулина [30] и лекарственных препаратов для лечения инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека [31].

Исследование репродуктивной и онтогенетической токсичности

Считается, что исследования лекарственных препаратов на животных, находящихся в определённой фазы репродуктивного цикла, лучше отражает их влияние на человека и позволяет более точно идентифицировать фазы, подверженные наибольшему риску, поэтому целью исследования репродуктивной токсичности является выявление любых эффектов одного или более действующих веществ на репродукцию млекопитающих на протяжении всего их жизненного цикла (от зачатия особи в первом поколении до зачатия особи во втором) [32].

При этом оценка риска применения лекарственного препарата во время беременности с целью снижения угрозы возникновения врождён-

ных дефектов развития, основанная на всесторонней оценке данных, и снижения неблагоприятного воздействия действующего вещества или его метаболитов на ребёнка, находящегося на грудном вскармливании, установленных по результатам их применения у животных и человека, является принципиальной задачей [33].

В силу особой клинической и социальной значимости нарушений углеводного обмена разработаны подробные требования к изучению репродуктивной токсичности для аналогов человеческого инсулина [34].

В дополнение к стандартным исследованиям репродуктивной токсичности при изучении возможности применения лекарственных препаратов у детей требуется, помимо прочего, проведение исследований на неполовозрелых животных [35].

Приводим пример практического изучения эмбриотоксического действия препарата ВИФЕРОН® в форме суппозитория в течение всего срока беременности крыс.

Исследования проведены на 50 крысах Вистар (30 самок, 20 самцов), вес 180—200 г. Первым днём беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках самок, подсаженных накануне к самцам в соотношении 3:2. Наблюдение за животными вели в течение всего срока беременности. Самок взвешивали на 1, 7 и 14 дни гестации. Животным вводили дозу препарата ВИФЕРОН®, в 20 раз превышающую максимальную терапевтическую для человека. В пересчёте на 1 кг веса она составляла 285720 МЕ ИФН. Контрольной группе вводили наполнитель. Препарат и контрольное вещество вводили в инертном наполнителе в объёме 0,2 мл на крысу. Препарат и наполнитель перед введением разогревали на водяной бане до 37—39°C, вводили в прямую кишку на глубину 2—2,5 см при помощи туберкулинового шприца и иглы с оливой.

На 22-й день беременности животных умерщвляли путём цервикальной дислокации. При вскрытии брюшной полости исследовали состояние репродуктивных органов: определяли количество жёлтых тел беременности в яичниках, мест имплантации в матке, живых и мёртвых плодов, резорбции. Извлечённые плоды осматривали на предмет выявления аномалий, взвешивали, определяли их краниокаудальный характер.

Основные полученные результаты. Препарат не оказывал влияния на общее течение беременности. Не было отмечено случаев прерывания беременности. ВИФЕРОН® не вызывал аномалий антенатального развития плода. При внешнем осмотре не было отмечено аномалий развития.

Выводы. ВИФЕРОН® не обладает эмбриотоксическим действием.

Изучение эмбриотоксических эффектов препарата ВИФЕРОН® в форме суппозитория,

проявляющихся в постнатальном периоде жизни потомства

Исследования проведены на крысах Вистар, масса 180—200 г. Животным вводили дозу препарата ВИФЕРОН®, в 20 раз превышающую максимальную терапевтическую для человека. В пересчёте на 1 кг веса она составляла 285720 МЕ ИФН. В опытной группе исследовано потомство от 13 крыс, в контрольной — 12. Для исследований оставляли по 8 крысят в помёте. Изучали физическое развитие, скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов, обучаемость и память.

Основные полученные результаты. В течение всей беременности не было отмечено каких-либо особенностей. Случаев спонтанной прерывания беременности не было.

Не было отмечено различий в физическом развитии животных двух групп. Формирование сенсорных рефлексов (переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, обонятельная реакция, реакция на акустический стимул, открытое поле) также было без особенностей. Способность к тонкой координации движений (переворачивание в воздухе, удержание на вращающемся цилиндре, открытое поле) не отличалась у животных двух групп. Обучаемость и память (активное избегание и его угасание) также не отличались.

Выводы. ВИФЕРОН® в форме суппозиторий не влияет на течение беременности, физическое развитие, скорость развития сенсорно-двигательных рефлексов, эмоционально-двигательное поведение и тонкую координацию движений в постнатальном периоде.

Прочие виды исследований

Исследование **токсикокинетики** — это сбор фармакокинетических данных как компонента доклинических токсикологических исследований или отдельные вспомогательные исследования, направленные на оценку системного воздействия лекарственного препарата с целью интерпретации токсикологических находок [36].

В настоящее время при разработке лекарственных препаратов также рекомендуется исследование их **иммунотоксических свойств**: способности подавлять или, наоборот, усиливать иммунный ответ. Первая ведет к снижению резистентности к инфекционным агентам и ослаблению противоопухолевой защиты, вторая — к возникновению и (или) усугублению аутоиммунных заболеваний и реакциям гиперчувствительности [37], поэтому изучение иммунотоксичности является важным элементом при оценке профиля безопасности новых лекарственных средств.

Для лекарственных препаратов, проникающих в кожу при их наружном или системном при-

менении важно изучить их **фотосенсибилизирующие свойства** — способность действующего вещества вызывать нежелательные лекарственные реакции в присутствии света. Целью таких исследований является выявление фототоксичности, фотоаллергенности, фотогенотоксичности и фотоканцерогенности [38, 39].

Поражение печени, обусловленное применением лекарственных средств, является частым явлением как в доклинических, так и в клинических исследованиях новых лекарственных веществ. Выявление **гепатотоксических нарушений** — процесс, охватывающий весь период разработки лекарственного препарата, а обнаружение гепатотоксического потенциала в доклинических исследованиях часто приводит к замедлению или отмене его разработки [40], поэтому важным требованием к проведению доклинических исследований является выработка единых подходов к оценке таких явлений.

Другим немаловажным, особенно в современных социальных условиях, является обнаружение и выявление потенциала разрабатываемого нового препарата **вызывать лекарственную зависимость**, в связи с чем приняты некоторые подходы к раннему (доклиническому) его выявлению [41—43].

Особенности доклинической разработки отдельных групп лекарственных препаратов

Подходы к **доклинической разработке противоопухолевых средств**, которые заведомо обладают «тяжелым» токсикологическими свойствами, также отличаются от стандартных, поэтому чтобы соблюсти баланс между ожидаемой пользой и возможным риском, к этой терапевтической группе на сегодняшний день предъявляются особые требования [44].

Ввиду особых физико-химических свойств **медицинские газы** также полностью не укладываются в стандартную схему токсикологических исследований, и поэтому для них разработаны особые требования, направленные, преимущественно, на изучение токсичности на дыхательную систему [45].

Доклиническая разработка **комбинированных лекарственных препаратов** должна учитывать возможное взаимодействие между действующими веществами, которое может привести к возникновению новых токсических эффектов, не свойственных отдельным действующим веществам [46].

При наличии у действующего вещества **хиральных свойств** предполагается проведение токсикологических исследований отдельных энантиомеров [47].

Все большее место в современной фармакологии занимают **лекарственные средства биотехнологического происхождения**. При их изучении применимы не все методы доклинической токсич-

кологии, разработанные в отношении «классических» лекарственных средств. Данное обстоятельство обуславливает необходимость изучения их эффективности и безопасности по другим программам, в рамках которой предусматривается изучение иммуногенности, но при этом не всегда требуется изучения стандартных токсикологических характеристик, как то: канцерогенность, генотоксичность и др. [48, 49]. При этом особые требования предъявляются к проведению токсикологических исследований **вакцин** [50].

Генная терапия, включающая в себя плазмидные ДНК, вирусные и невирусные векторы, генетически модифицированные вирусы и клетки, разработанные с целью профилактики и лечения заболеваний человека, является современным направлением в медицине. Потенциальная биологическая угроза, которую может нести в себе генная терапия, должна быть выявлена на ранних этапах, в том числе благодаря доклиническим исследованиям [51].

Таким образом, современная доклиническая токсикология учитывает последние достижения фундаментальной фармакологии и разрабатывает дифференцированные методы оценки безопасности лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html> (дата обращения: 28.11.2011).
2. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization For Pharmaceuticals, M3(R2). Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2_Guideline.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
3. Европейское агентство по лекарственным средствам [официальный сайт]. URL: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000083.jsp&mid=WC0b01ac0580027548 (дата обращения: 28.11.2011).
4. Администрация по товарам медицинского потребления Австралии [официальный сайт]. URL: <http://www.tga.gov.au/industry/pm-euguidelines-adopted-nonclinical.htm> (дата обращения: 28.11.2011).
5. Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development - 2nd ed. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data [официальный сайт ВОЗ]. URL: <http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/good-laboratory-practice-handbook/pdf/glp-handbook.pdf> (дата обращения: 29.11.2011).
6. Lees P., Cunningham F. M., Elliott J. Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. J Vet Pharmacol Ther 2004; 27: 6: 397—414.
7. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Safety - M4S(R2). Nonclinical overview and nonclinical summaries of module 2, organisation of module 4. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/CTD/M4_R2_Safety/M4S_R2_.pdf (дата обращения: 28.11.2011).
8. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, S7A. Международная конференция по гармонизации технических требований к

Современные тенденции

Основополагающими принципами современных доклинических исследований является не только изучение риска для пациента, но и потенциального неблагоприятного влияния на медицинский персонал, лиц, ухаживающих за пациентом, других лиц, находящихся с ним в контакте, на «общество в целом», а также на животных, растения и микроорганизмы [52—54].

Другим общепризнанным принципом является защита животных, в том числе участвующих в доклинических исследованиях [55]. При этом в настоящее время рекомендуется во всех возможных случаях проводить исследования на клеточных и тканевых культурах *in vitro*, избегая включения лабораторных животных в исследование [56, 57].

Учитываются также проблемы контаминации контрольных животных исследуемым веществом [58].

Заключение

Таким образом, доклинические исследования являются важным этапом разработки лекарственных препаратов, являясь обязательным условием перед началом их применения в клинических исследованиях [59].

- регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf (дата обращения: 28.11.2011).
9. Concept Paper on The Development of a CHMP Guideline on the Non-Clinical Requirements to Support Early Phase I Clinical Trials with Pharmaceutical Compounds. Committee for Medicinal Products for Human Use (EMA/CHMP/SWP/91850/2006) официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003979.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
10. The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals, S7B. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf (дата обращения: 28.11.2011).
11. Pharmacokinetics. In Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing, & Health Professions, 2009 [электронный ресурс]. URL: <http://www.credoreference.com/entry/ehsmosbymed/pharmacokinetics> (дата обращения: 28.11.2011).
12. Pharmacokinetics and Metabolic Studies in the Safety Evaluation of New Medicinal Products in Animals. Директива 75/318/ЕЕС [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002886.pdf (дата обращения: 28.11.2011).
13. Questions and answers on the withdrawal of the 'Note for guidance on single dose toxicity. Committee for Medicinal Products for Human Use (EMA/CHMP/SWP/81714/2010) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500094590.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
14. Repeated dose toxicity. Committee for Medicinal Products for Human Use (CPMP/SWP/1042/99). [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003102.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
15. Guideline on Repeated Dose Toxicity. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/SWP/1042/99 Rev 1 Corr*) [официальный сайт Ев-

- ропейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
16. Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing), S4. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S4/Step4/S4_Guideline.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
 17. Non-clinical local tolerance testing of medicinal products. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/SWP/2145/00) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003315.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
 18. Concept paper on the need for revision of the Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/SWP/2145/00) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500109476.pdf (дата обращения: 29.11.2011).
 19. Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals, S2A. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003146.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 20. Genotoxicity: a Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals, S2B. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003147.pdf (30.11.2011).
 21. Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, S2(R1). Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 22. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. Committee for Human Medicinal Products (EMA/CHMP/QWP/251344/2006) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 23. CHMP SWP Reflection Paper on The Assessment of the Genotoxic Potential of Antisense Oligodeoxynucleotides. Committee for Human Medicinal Products (Doc. Ref.EMA/CHMP/SWP/199726/2004) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003149.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 24. Position Paper on the genotoxic and carcinogenic potential of phenolphthalein. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/818/97) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Position_statement/2009/09/WC500003148.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 25. Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals, S1A. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1A/Step4/S1A_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 26. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals, S1B. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1B/Step4/S1B_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 27. Carcinogenic potential. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/SWP/2877/00) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003258.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 28. Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals, S1C(R2). Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1C_R2/Step4/S1C_R2_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 29. CHMP SWP Conclusions and recommendations on the use of genetically modified animal models for carcinogenicity assessment. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/SWP/2592/02 Rev 1) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003257.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 30. Points to consider on the Non-clinical assessment of the carcinogenic potential of human insulin analogues. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/SWP/372/01) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003252.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 31. Carcinogenicity Evaluation of Medicinal Products for the Treatment of HIV Infection. Committee for Human Medicinal Products (EMA/194898/2006) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003255.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 32. Detection of Toxicity To Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility, S5(R2). Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5_R2/Step4/S5_R2_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 33. Risk Assessment of Medicinal Products on Human Reproduction and Lactation: From Data to Labelling. Committee for Human Medicinal Products (EMA/CHMP/203927/05) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003307.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 34. Points to consider on the Need for assessment of reproduction toxicity of human insulin analogues. Committee for Human Medicinal Products (CHMP/SWP/169215/05) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003309.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 35. Need for Non-Clinical Testing in Juvenile Animals on Human Pharmaceuticals for Paediatric Indications. Committee for Human Medicinal Products (CHMP/SWP/169215/05) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003305.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 36. Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies, S3A. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3A/Step4/S3A_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 37. Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals, S8. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S8/Step4/S8_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 38. Guidance on Photosafety Testing. Committee for Human Medicinal Products (CHMP/SWP/398/01) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003353.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
 39. Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals, S10 (Final Concept Paper). Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: [48](http://www.ich.org/filead-

</div>
<div data-bbox=)

- min/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S10/Concept_Paper/S10_Final_Concept_Paper_June_2010x.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
40. Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity // Committee for Human Medicinal Products (CHMP/SWP/150115/06) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500094591.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
41. Non-Clinical Investigation of the Dependence Potential of Medicinal Products. Committee for Human Medicinal Products (CHMP/SWP/94227/04) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003360.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
42. Background to the CPMP Position Paper on selective serotonin uptake inhibitors (SSRIs) and dependency/withdrawal reactions. Committee for Human Medicinal Products (EMEA/CPMP/2775/99) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003357.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
43. Background to the CPMP Position Paper on possible pre-clinical studies to investigate addiction and dependence/withdrawal related to the use of selective serotonin uptake inhibitors (SSRIs). Committee for Human Medicinal Products (CPMP/2278/00) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003464.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
44. Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals, S9. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S9/Step4/S9_Step4_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
45. Medicinal Gases: Pharmaceutical Documentation (including recommendation on non-clinical safety requirements for well established medicinal gases). Committee for Human Medicinal Products (CPMP/QWP/1719/00) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003450.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
46. Non-Clinical Development of Fixed Combinations of Medicinal Products. Committee for Human Medicinal Products (CHMP/GTWP/125459/2006) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003976.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
47. Investigation of chiral active substances. Директива Европейского Союза 75/318/EEC) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002816.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
48. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, S6(R1). Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf (дата обращения: 30.11.2011).
49. Comparability of medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance -annex on non-clinical and clinical issues. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/3097/02*) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003963.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
50. Pre-clinical pharmacological and toxicological testing of vaccines. Committee for Human Medicinal Products (CPMP/SWP/465/95) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004004.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
51. Non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. Committee for Human Medicinal Products (CHMP/GTWP/125459/2006) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003743.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
52. Guideline on Scientific Requirements for The Environmental Risk Assessment of Gene Therapy Medicinal Products. Committee for Human Medicinal Products (Doc. Ref. EMEA/CHMP/GTWP/125491/2006) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003744.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
53. Environmental Risk Assessment for Human Medicinal Products Containing or Consisting of GMOs. Постановление Совета ЕС 2309/93 [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003989.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
54. Questions and answers on the guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Committee for Human Medicinal Products (EMA/CHMP/SWP/44609/2010) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2011/04/WC500105107.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
55. Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. ATLA 30, Supplement 2, 217-219, 2002.
56. Replacement of Animal Studies by *in vitro* Models // Committee for Human Medicinal Products (CHMP/SWP/728/95) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003354.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
57. Concept paper on the Need for Revision of the Position on the Replacement of Animal Studies by *in vitro* Models (CPMP/SWP/728/95) // Committee for Human Medicinal Products (EMA/CHMP/SWP/169839/2011) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105110.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
58. Evaluation of Control Samples for Non - clinical Safety Studies: Checking for Contamination with the Test Substance. Committee for Human Medicinal Products (CHMP/GTWP/125459/2006) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003974.pdf (дата обращения: 01.12.2011).
59. Guideline on Strategies to Identify and Mitigate Risks for First-Inhuman Clinical Trials with Investigational Medicinal Products. Committee for Human Medicinal Products (EMEA/CHMP/SWP/28367/07) [официальный сайт Европейского агентства по лекарственным средствам]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002988.pdf (дата обращения: 01.12.2011).

Молекулярные мишени тамоксифена, отличные от эстрогеновых рецепторов

Т. А. БОГУШ, Е. А. ДУДКО, Е. А. БОГУШ, Б. Е. ПОЛОЦКИЙ, С. А. ТЮЛЯНДИН, М. И. ДАВЫДОВ

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Tamoxifen Molecular Targets Different From Estrogen Receptors

T. A. BOGUSH, E. A. DUDKO, E. A. BOGUSH, B. E. POLOTSKY, S. A. TYULYANDIN, M. I. DAVYDOV

N. N. Blokhin Russian Centre of Oncology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Экспериментальные работы, раскрывающие всё новые и новые биологические эффекты воздействия тамоксифена на опухолевые клетки как экспрессирующие, так и неэкспрессирующие эстрогеновые рецепторы, позволяют по-новому взглянуть на, казалось бы, хорошо известный препарат. В обзоре описаны мишени тамоксифена, блокирование которых вызывает ингибирование роста опухолевых клеток и процесса ангиогенеза, стимулирование программированной смерти клеток (апоптоза, аутофагии и некроза), ингибирование механизма множественной лекарственной резистентности, торможение инвазии и метастазирования. Так как во всех случаях последствия взаимодействия тамоксифена с клетками являются прогностически благоприятными, как с точки зрения торможения роста опухоли и её метастазирования, так и с точки зрения чувствительности к лекарственной терапии, авторы рассматривают это как чрезвычайно важное «добавление» к антиэстрогенному эффекту тамоксифена. Приведены аргументы, которые позволяют считать стратегию длительной адъювантной терапии тамоксифеном, созданную ещё в 70 годах XX века профессором Craig V. Jordan для лечения рака молочной железы с позитивным статусом эстрогеновых рецепторов, применимой и для других опухолей. Это, прежде всего, описанный в последние годы факт экспрессии в солидных опухолях практически всех известных локализаций и гистологических типов эстрогеновых рецепторов бета, которые также являются мишенью тамоксифена. Авторы считают, что для полной реализации всех сторон биологической активности тамоксифена при длительной адъювантной терапии злокачественных новообразований разных локализаций, помимо оценки эстрогеновых рецепторов, необходим молекулярно-биологический отбор больных с учётом экспрессии других клеточных мишеней антиэстрогена.

Ключевые слова: тамоксифен, апоптоз, ангиогенез, метастазирование, множественная лекарственная резистентность.

Experimental studies showing ever new biological effects of tamoxifen on tumor cells, both expressing and nonexpressing estrogen receptors, are providing a novel conception of the drug, likely well known at present. The review describes tamoxifen targets, whose blocking induces inhibition of tumor cell growth and angiogenesis, stimulation of the programmed cell death (apoptosis, autophagia and necrosis), inhibition of multiple drug resistance mechanism and inhibition of invasion and metastasizing. In all the events, the results of the tamoxifen interaction with the cells are prognostically favourable from the viewpoint of both the inhibition of the tumor growth and metastasizing and the susceptibility to the medicinal therapy, that is considered by some authors as an extremely important addition to the tamoxifen antiestrogenic effect. The strategy of long-term tamoxifen adjuvant therapy of breast cancer with positive status of the estrogen receptors was developed by Craig V. Jordan as far back as in the seventies of the XXth century, however there are arguments allowing to consider it also useful for the treatment of other tumors. First of all it is the fact described lately in regard to expression of estrogen β -receptors in solid tumors of practically all known localization and histological types, that are also the targets of tamoxifen. Apart from estimation of estrogen receptors, it is believed by some authors that molecular and biological choice of patients is necessary with an account of expression of other cell targets of antiestrogen for complete realization of all the aspects of tamoxifen biological activity in long-term adjuvant therapy of malignant tumors of various localization.

Key words: tamoxifen, apoptosis, angiogenesis, metastasizing, multiple drug resistance.

Введение

Несмотря на стремительное развитие гормональной противоопухолевой терапии и связанное с этим появление новых лекарств, тамоксифен является одним из наиболее ярких и неизменно эффек-

тивных «долгожителей» среди лекарственных препаратов, которые используются при лечении злокачественных новообразований. Это многолетний так называемый «золотой стандарт» в адъювантном лечении рака молочной железы с положительным статусом эстрогеновых рецепторов. Это первый и наиболее «старый» таргетный препарат, который, по-прежнему, занимает лидирующую позицию в лечении рака молочной железы [1, 2].

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

Экспериментальные работы последних лет раскрывают всё новые и новые биологические эффекты воздействия тамоксифена на опухолевые клетки. Выявлен обширный спектр мишеней тамоксифена, отличных от эстрогеновых рецепторов, которые являются ключевыми точками сигнальных каскадов, активирующих пролиферацию клеток, определяют агрессивность течения опухолевого процесса и чувствительность к химиотерапии. Это позволяет по-новому взглянуть на, казалось бы, хорошо известный препарат и задуматься о новых показаниях к его применению, в частности при лечении солидных опухолей, отличных от рака молочной железы, в том числе и в комбинации с современными таргетными препаратами. Ниже рассмотрены в качестве примеров важнейшие молекулярные мишени тамоксифена.

Ингибирование протеинкиназы C

Протеинкиназа C (PKC) — это серин-треонин специфическая протеинкиназа, которая экспрессируется практически во всех клетках млекопитающих и играет исключительно важную роль в передаче внутриклеточных сигналов. Субстратами PKC в различных клетках служат ядерные белки, белки цитоскелета, ферменты. PKC участвует в передаче широкого набора внешних сигналов и, в том числе ряда сигналов, регулирующих клеточный рост.

На культурах клеток рака простаты человека PC3 и PC3-M выявлен цитотоксический эффект тамоксифена, который на молекулярном уровне был ассоциирован с понижением активности протеинкиназы C, с последующей индукцией ингибитора циклинзависимых киназ p21(waf1/cip1), дефосфорилированием опухолевого супрессора Rb и остановкой клеточного цикла в фазе G1/S, причем такой же эффект вызывал и Ro31-8220 — специфический ингибитор PKC [3]. Подобное действие антиэстроген проявляет и в других типах опухолевых клеток, таких как гепатоклеточная карцинома [4] и астроцитома [5]. Ингибирующее воздействие тамоксифена на PKC показано и в экспериментах на клеточных линиях злокачественных глиом [6].

На культуре клеток рака молочной железы MCF-7 показано, что антипролиферативное действие тамоксифена реализуется при непосредственном взаимодействии антиэстрогена с PKC-ε, которая ассоциирована с процессами дифференцировки и роста опухолевых клеток [7].

Подавление метастазирования опухолей

В ряде работ описан важнейший эффект тамоксифена — антиметастатическое действие ан-

тиэстрогена, которое может проявляться независимо от экспрессии в клетках человека эстрогеновых рецепторов, и ассоциировано с нарушением работы многих клеточных мишеней. Так, в клетках аденокарциномы лёгкого SPC-A-1, а также в клетках рака молочной железы MCF-7 тамоксифен увеличивал экспрессию гена тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP1 и уменьшал экспрессию гена металлопротеиназы 9, что приводило к подавлению инвазии клеток в матрикеле. Обе линии клеток экспрессировали эстрогеновые рецепторы [8].

Антиметастатическая активность тамоксифена описана на клетках рака толстой кишки с положительным статусом эстрогеновых рецепторов и высоким метастатическим потенциалом. Антиэстроген уменьшал экспрессию матриксной металлопротеиназы MMP7 и миграцию клеток в монослойной культуре *in vitro* [9].

Ингибирование роста и миграции клеток *in vivo* показано также на клеточных культурах рака щитовидной железы человека, не экспрессирующих эстрогеновых рецепторов. Этот эффект подтверждён и *in vivo* на ксенографтах клеток линии FTC133 у голых мышей. Показано, что лечение тамоксифеном приводит к ингибированию роста трансплантированной опухоли [10].

В культуре клеток мышинной меланомы B16BL6 воздействие тамоксифена приводило к ингибированию синтеза мРНК и активности матриксных металлопротеиназ. При этом в опытах *in vivo* на мышах продемонстрировано значительное ингибирование метастазирования меланомы в лёгкие [11].

На клетках рака молочной железы крыс линии Mat B-III дикого типа и с гиперэкспрессией рецептора урокиназы uPAR тамоксифен ингибировал транскрипцию гена, синтез мРНК и продукцию белка uPAR. При этом *in vivo* антиэстроген не только значительно уменьшил размер опухолевого узла после трансплантации опухолевых клеток крысам линии Fisher, но и подавил процесс метастазирования [12].

Активация программированной клеточной смерти

Значительный вклад в цитостатический эффект тамоксифена вносит его способность активировать процесс программированной клеточной гибели — апоптоз.

Описаны разные механизмы стимуляции апоптоза тамоксифеном в клетках разного гистогенеза, при этом ингибирование путей трансдукции сигналов от фосфолипаз C и D, а также протеинкиназы C является одним из возможных механизмов действия тамоксифена, не зависящих от экспрессии в клетках эстрогеновых рецепторов [13].

В клетках рака молочной железы с экспрессией эстрогеновых рецепторов под воздействием антиэстрогена происходит активация каспаз 6, 7 и 9 [14]. Тамоксифен вызывает апоптоз в клетках крысиной глиомы линии С6 посредством ингибирования активации протеинкиназы АКТ и транзиторной активации с-Jun N-концевой киназы JNK, при сохраняющейся во времени активации MAP киназы ERK [15].

Описан механизм стимуляции апоптоза при воздействии тамоксифена при гиперэкспрессии антиапоптотических белков. Так, при увеличенном уровне Bcl-2, антиэстроген вызывал апоптоз, активируя белки JNK, p38 и фосфорилирование с-Jun, повышая при этом ДНК связывающую активность транскрипционного фактора AP-1, экспрессию белка из семейства факторов некроза опухоли FasL и активируя каспазу 8. В клетках с пониженной экспрессией белка этого эффекта не наблюдали [16]. Показано также, что тамоксифен может вызывать апоптотические изменения в клетках, как понижая уровень Bcl-2 [13, 17], так и не влияя на количество в клетке этого антиапоптотического белка [18, 19].

С точки зрения разнообразия эффектов на клетку интересно также влияние тамоксифена на экспрессию других белков, участвующих в апоптотическом процессе. Так же как и в случае с Bcl-2, антиэстроген может по-разному воздействовать на уровень этих белков. Так, ингибируя рост и индуцируя апоптоз в клетках карциномы жёлчных протоков человека линии QBC939, тамоксифен увеличивал уровень опухолевого супрессора p53 и ингибитора циклинзависимых киназ p21(waf1/cip1), останавливая клеточный цикл в фазах G0-G1. При этом также происходило уменьшение экспрессии генов циклина D и C-Мус, повышение экспрессии белков Bcl-2, Вах и каспаз 6, 7 и 9 [20].

Тамоксифен способен активировать также митохондриальный путь программы апоптоза [21]. Антиэстроген стимулировал апоптоз и оксидативный стресс посредством зависимого от митохондрий и NO-зависимого пути активации, при котором происходит увеличение концентрации Ca^{2+} в митохондриях. В результате стимуляции тамоксифеном митохондриальной NO-синтетазы наступало угнетение митохондриального дыхания, уменьшалось высвобождение цитохрома С, повышалось перекисное окисление липидов в митохондриях и уменьшалась агрегация митохондрий [22, 23]. В результате этих процессов наступал апоптоз опухолевых клеток, завершающийся образованием апоптотических телец и их фагоцитозом.

В качестве II типа программированной смерти клеток в настоящее время выделяют гибель клеток, при которой запускается программа аутофагии, то есть деградация органелл и цитоплазматического

материала при участии внутриклеточных мембранных структур. При воздействии разных селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (в том числе и тамоксифена) происходило зависимое от дозы антиэстрогена ингибирование клеточной гибели II типа [24]. Последующие работы показали, что процесс активации аутофагии тамоксифеном начинается с деполимеризации актина и промежуточных филаментов [25]. Подтверждение того, что тамоксифен вызывает активацию аутофагии получено также в серии работ, выполненных на клеточных линиях первичного и метастатического рака молочной железы [26], рака толстой кишки [27], а также лимфомы [28].

И наконец, третий тип клеточной гибели, который вызывает тамоксифен — программированный некроз. Индуцировать некроз можно, если активировать программу апоптоза связыванием таких лигандов, как FasL (белок из семейства фактора некроза опухоли), TRAIL (ассоциированный с фактором некроза опухоли лиганд, индуцирующий апоптоз), а также вызывая гиперэкспрессию проапоптотического белка Вах, одновременно, либо ингибируя активность каспаз, либо вызывая гиперэкспрессию антиапоптотических белков. Тамоксифен индуцирует апоптоз в опухолевых клетках, содержащих рецепторы Fas, посредством регулирования экспрессии FasL. Этим механизмом объясняют селективную стимуляцию апоптоза в остеокластах, что предотвращает резорбцию костной ткани и остеопороз [29].

Если проанализировать, в каких фазах клеточного цикла возможен тот или иной вариант гибели клеток, то складывается следующая картина. В отличие от апоптоза, который может запускаться в разных фазах клеточного цикла, в том числе и собственно в митозе в форме митотической катастрофы, аутофагическая гибель развивается преимущественно в непродлиферирующих клетках. Однако если в пролиферирующих клетках подавлены механизмы апоптоза, например инактивированны каспазы, то гибель пролиферирующих клеток осуществляется по механизму программированного некроза. Таким образом, комбинация различных вариантов клеточной гибели, индуцированной тамоксифеном, определяет многоплановое воздействие антиэстрогена на опухоль.

В комбинации с другими веществами, активирующими апоптоз, выявлен синергизм действия тамоксифена, что может оказаться важным для преодоления устойчивости к терапии антиэстрогеном. Так, совместное применение тамоксифена и TRAIL приводит к уменьшению уровня антиапоптотических белков FLIP и Bcl-2, с одновременным увеличением уровня проапоптотических белков FADD, tBid, Вах, каспаз 8 и 9 в опухолях молочной железы, независимо от статуса эстрогеновых рецепторов [30]. Усиление апопто-

тического эффекта тамоксифена описано при применении антиэстрогена в комбинации с индуктором апоптоза росковитином, который ингибирует циклинзависимые киназы, преимущественно воздействуя на киназы CDK2, CDK7 и CDK9. Синергизм апоптотического эффекта двух препаратов проявился на клетках рака молочной железы, экспрессирующих эстрогеновые рецепторы, тогда как антагонизм — при отсутствии в клетках эстрогеновых рецепторов [31–33].

Таким образом, стимуляция апоптоза, аутофагии и некроза, в зависимости от клеточного контекста, вносит вклад в окончательный эффект тамоксифена и расширяет показания к применению антиэстрогена, в том числе и в комбинации с другими препаратами.

Ингибирование ангиогенеза

В настоящее время общепризнано, что ангиогенез является необходимым условием для роста злокачественных опухолей и развития метастазов. В литературе имеется большое количество данных, о том, что тамоксифен обладает антиангиогенными свойствами наравне с другими антиангиогенными препаратами [34–36].

Способность тамоксифена ингибировать ангиогенез испытана на классических моделях, используемых для изучения антиангиогенных свойств: исследование плотности микрососудов в фибросаркоме крыс, сосудистого «ростка» аортального кольца и хориоаллантоисной оболочки куриного яйца, и роговицы кроликов. Эффект подавления образования сосудов тамоксифеном широко изучен *in vivo* и *in vitro* и продемонстрирован на моделях опухолей с экспрессией и без экспрессии эстрогеновых рецепторов [37, 38].

Существует несколько механизмов, объясняющих антиангиогенный эффект тамоксифена: способность ингибировать циклинзависимый рост эндотелиальных клеток [39], модулирование трансформирующего фактора роста TGF- β 1 в клетках рака молочной железы [40], ингибирование фактора роста эндотелия сосудов VEGF и фактора роста фибробластов bFGF [37, 41–43].

VEGF является ключевым фактором в промоции опухолевого ангиогенеза. Экспрессия VEGF усиливается в ответ на гипоксию, активацию онкогенов и различных цитокинов. VEGF вызывает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, ингибирует апоптоз.

Антиангиогенная активность тамоксифена, а также других антиэстрогенных препаратов (нафоксидина, кломифена и ICI 182,780) не связана с наличием в опухоли эстрогеновых рецепторов, а обусловлена непосредственным ингибированием VEGF и bFGF, что описано в работе на шестидневной модели хориоаллантоисной мембраны

куриного яйца. Показано также, что тамоксифен ингибирует секрецию VEGF в клетках рака молочной железы человека линии MCF-7 с экспрессией эстрогеновых рецепторов [41]. Кроме того, в нормальной ткани молочной железы, помимо уменьшения уровня проангиогенных факторов VEGF и ангиогенина, тамоксифен увеличивал уровень антиангиогенного фактора ангиостатина [42].

Ещё один механизм антиангиогенного действия тамоксифена — это увеличение экспрессии антагониста рецептора интерлейкина-1 IL-1Ra, который предотвращает проведение сигнала от интерлейкинов IL-1 α и IL-1 β . Так как IL-1 α и IL-1 β являются стимуляторами ангиогенеза в опухоли, ингибирование действия этих интерлейкинов приводит к ослаблению активации образования новых сосудов. На мышинной модели рака молочной железы человека показано, что терапия тамоксифеном приводит к увеличению экспрессии антагониста рецептора интерлейкина-1 IL-1Ra, чем можно объяснить ингибирование ангиогенеза [44].

Взаимодействие с белками множественной лекарственной резистентности

Ещё одной клеточной мишенью тамоксифена являются белки, которые выбрасывают из клеток различные противоопухолевые препараты, отличающиеся по структуре и механизму действия, и ассоциированные с механизмом множественной лекарственной резистентности (MultiDrug Resistance — MDR). Это транспортные белки, принадлежащие к семейству ABC-транспортёров, в частности, Pgp — Р-гликопротеин (P-glycoprotein), MRPs-белки множественной лекарственной резистентности (Multidrug Resistance-associated Proteins) и BCRP — белок резистентности рака молочной железы (Breast Cancer Resistance Protein). Это так называемые маркёры множественной лекарственной резистентности, к которым относится также белок цитоплазматических рибонуклеопротеиновых частиц (vaults) — MVP (Major Vault Protein), известный также как LRP (Lung Resistance-related Protein).

В экспериментах на культурах клеток и в опытах на животных показано, что тамоксифен усиливает специфическую активность ряда цитостатиков в отношении разных опухолей с фенотипом множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с экспрессией одного из главных маркёров — Pgp [45, 46]. Кроме того, в культурах клеток разного гистогенеза выявлено взаимодействие тамоксифена с Pgp и конкуренция ряда противоопухолевых препаратов с верапамилом и тамоксифеном за связывание с Pgp, что, по-видимому, и обуславливает описанный феномен [47, 48]. Показано также, что в клетках холангио-

карциномы человека линии QBC939 с фенотипом множественной лекарственной резистентности тамоксифен усиливает эффект адриамицина, митомицина и виндезина. При этом добавление к комбинации тамоксифена с противоопухолевыми препаратами специфических антител к Pgp блокировало эффект антиэстрогена, что указывает на

возможность прямого взаимодействия антиэстрогена с транспортёром [49]. Таким образом, эффект тамоксифена можно охарактеризовать как восстановление чувствительности к химиотерапии опухолевых клеток с фенотипом множественной лекарственной резистентности и ассоциировать этот эффект с воздействием препарата на Pgp.

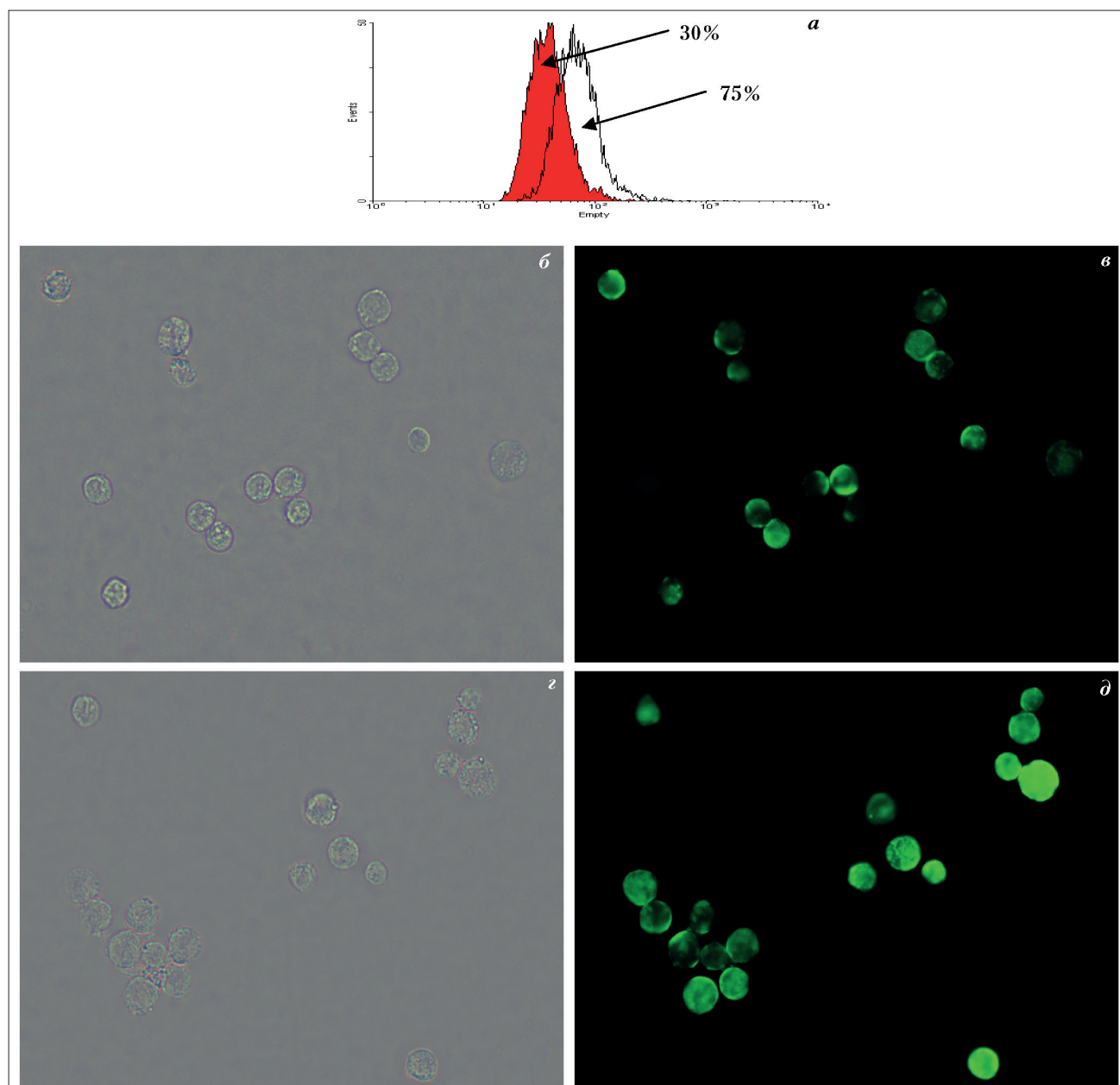


Рис. 1. Влияние тамоксифена на специфическое взаимодействие моноклональных антител (клон 4ЕЗ, Abcam) с Pgp в клетках Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat.

Здесь и на рис. 2, 3: **а** — гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции (проточный цитофлуориметр FACSCanto II). По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции (условные единицы); по оси ординат — количество клеток. Закрашенная гистограмма — интенсивность флуоресценции клеток без воздействия тамоксифена; незакрашенная — после инкубации с тамоксифеном. Цифры на рис. указывают количество специфически флуоресцирующих клеток по отношению к показателю изотипического контроля (в %). **б, в, г, д** — фотографии клеток после флуоресцентного окрашивания моноклональными антителами к Pgp с использованием светового флуоресцентного микроскопа (Leica DMI 6000B, увеличение $\times 400$). Клетки в световом и соответственно флуоресцентном поле: **б и в** — без воздействия тамоксифена, **г и д** — после воздействия тамоксифена.

В прямых экспериментах на культуре клеток эритроидного лейкоза человека линии K562 по изучению влияния тамоксифена на связывание моноклональных антител с Pgp выявлена конкуренция между антиэстрогеном и антителами [50]. Аналогичный результат получен на культуре клеток рака шейки матки человека линии HeLa при исследовании влияния тамоксифена на связывание моноклональных антител с MRP1 [51].

В исследованиях авторов обзора (неопубликованные данные) конкурентное взаимодействие тамоксифена с Pgp, MRP1, а также с LRP визуализировано с использованием флуоресцентной микроскопии. Во всех случаях изменение специфического флуоресцентного окрашивания клеток при

воздействии тамоксифена подтверждено при исследовании суспензии клеток на проточном цитофлуориметре (рис. 1—3). На клетках суспензионной культуры Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat показано, что после инкубации с тамоксифеном количество специфически флуоресцирующих клеток и интенсивность флуоресценции отдельных клеток, окрашенных моноклональными антителами к Pgp, увеличивается (рис. 1). Напротив, количество специфически флуоресцирующих клеток и интенсивность флуоресценции отдельных клеток при окрашивании монослойных культур клеток человека рака шейки матки HeLa и аденокарциномы лёгкого A549 моноклональными антителами к MRP1 и LRP уменьшилось после воздействия та-

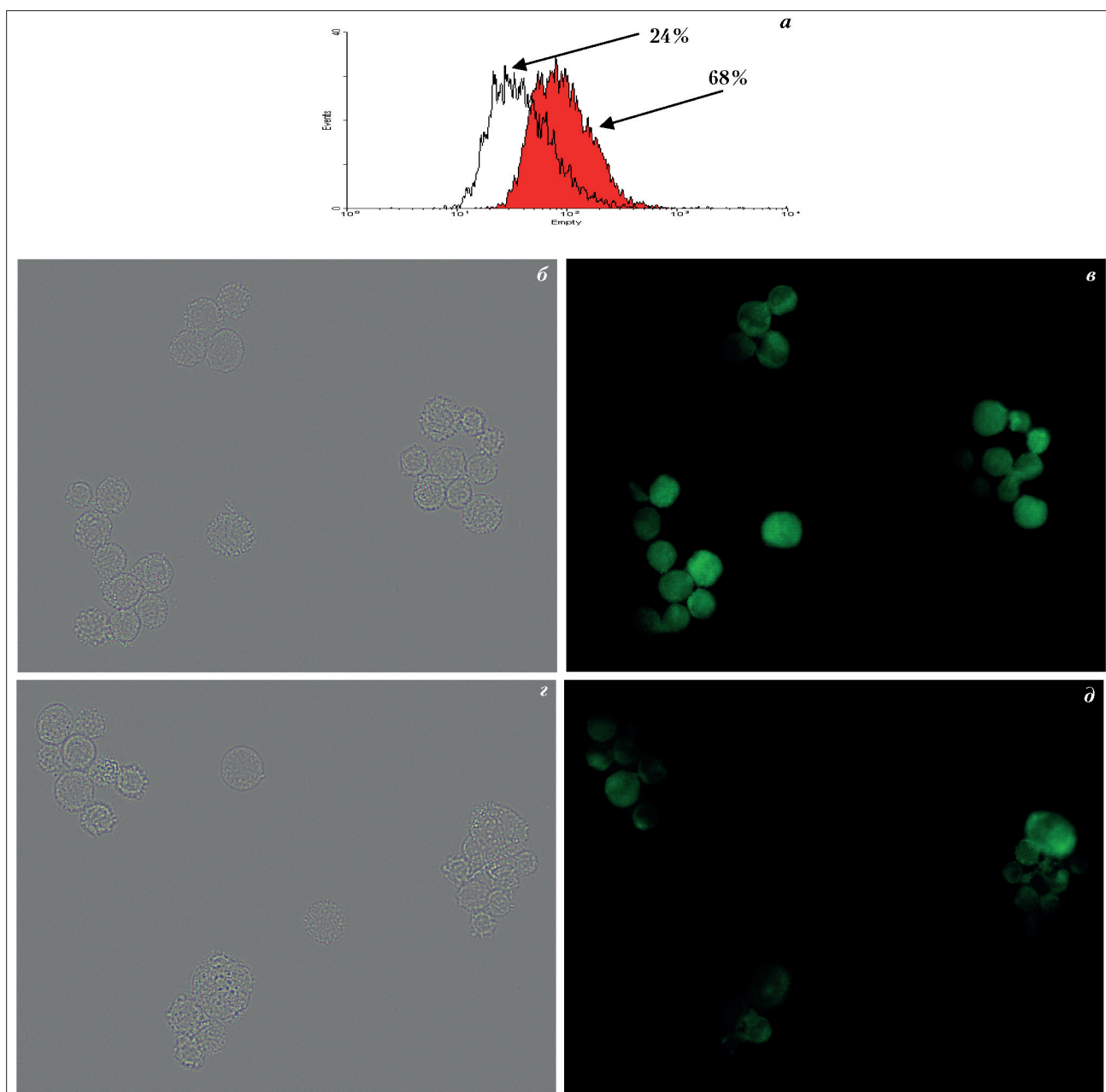


Рис. 2. Влияние тамоксифена на специфическое взаимодействие моноклональных антител (клон MRPm5, Abcam) с MRP1 в клетках рака шейки матки человека линии HeLa

моксифена (рис. 2 и 3). Эти данные с очевидностью свидетельствуют о взаимодействии антиэстрогена с маркерами множественной лекарственной резистентности Pgp, MRP1 и LRP, что должно приводить к нарушению взаимодействия противоопухолевых препаратов с этими транспортными белками, а следовательно, ингибировать связанный с этим механизм лекарственной устойчивости.

Считаем, что результатом такого взаимодействия тамоксифена с Pgp, MRP1 и LRP неизбежно должно явиться снижение внутриклеточной концентрации антиэстрогена, доступного для взаимо-

действия с другими клеточными мишенями, в том числе и с эстрогеновыми рецепторами. Таким образом, взаимодействие тамоксифена с Pgp, MRP1 и LRP в клетках с фенотипом множественной лекарственной резистентности может привести к неблагоприятному эффекту — к снижению собственной эффективности антиэстрогена. Очевидно, что чем больше в клетке гиперэкспрессия транспортных белков, тем больше их прогностическая значимость для предсказания устойчивости к тамоксифену. Важно подчеркнуть, что речь не идет о прогнозировании механизма лекарственной рези-

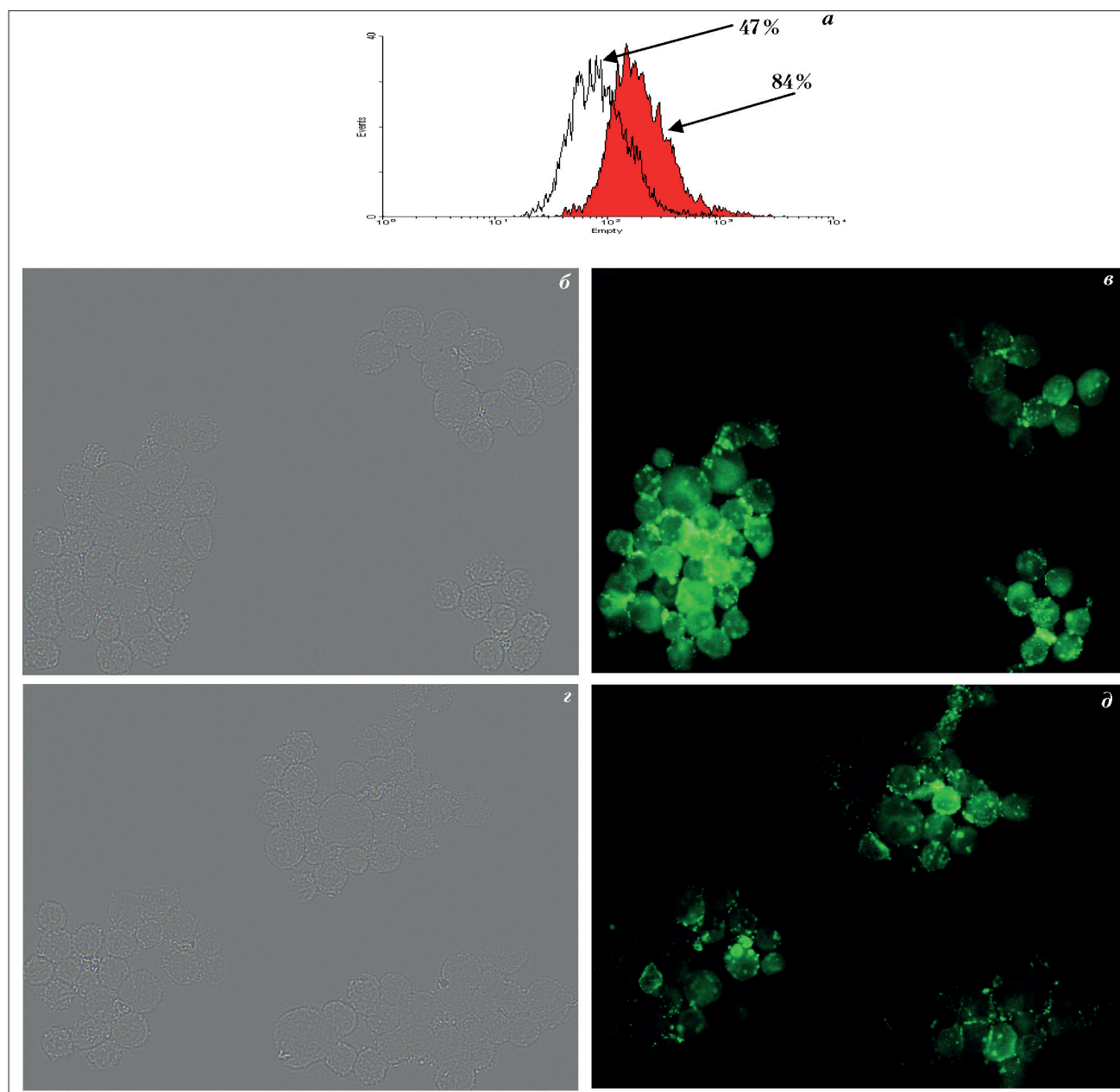


Рис. 3. Влияние тамоксифена на специфическое взаимодействие моноклональных антител (клон LMR5, Abcam) с LRP в клетках аденокарциномы человека линии A549.

На рис. **в** и **д** отчётливо видна зернистость флуоресцентного окрашивания клеток антителами к LRP, который в отличие от других белков множественной лекарственной резистентности существует не в свободном виде, а в составе рибонуклеопротеиновых частиц — так называемых vaults. Эти частицы могут образовывать трубчатые структуры, которые при флуоресцентном анализе выявляются как светящаяся зернистость.

Биологические эффекты тамоксифена, реализующиеся независимо от статуса эстрогеновых рецепторов опухоли

Биологические эффекты тамоксифена	Механизмы реализации биологических эффектов тамоксифена
Стимуляция программированной смерти клеток: апоптоз, аутофагия, некроз	Активация каспаз 6, 7, 8 и 9 Активация киназы JNK, проапоптотических белков p53, p38 и FasL Понижение уровня антиапоптотического белка Bcl-2
Подавление пролиферации клеток	Ингибирование протеинкиназы C Стимуляция трансформирующего фактора роста TGF- β 1
Ингибирование ангиогенеза	Ингибирование фактора роста эндотелия сосудов VEGF, фактора роста фибробластов bFGF и синтеза ангиогенина Стимуляция IL-1Ra — антагониста рецептора интерлейкина-1
Подавление инвазии и метастазирования	Стимуляция тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP1 Ингибирование матриксных металлопротеиназ MMP 7 и 9 Ингибирование рецептора урокиназы uPAR
Ингибирование механизма множественной лекарственной резистентности	Взаимодействие с белками множественной лекарственной резистентности — Pgp, MRP1 и LRP

стентности, ассоциированной с выбросом препаратов из клеток. Это принципиально новый путь снижения эффективности тамоксифена, который детерминирован не функционированием Pgp, MRP1 и LRP, а обусловлен внутриклеточной «инактивацией» тамоксифена при его конкурентном связывании с этими белками по пути к собственным клеточным мишеням.

Заключение

В заключении мы бы хотели вернуться к созданной ещё в 70 годах XX века профессором Craig V. Jordan стратегии длительного адъювантного лечения тамоксифеном, благодаря которой антиэстроген в течение более 40 лет занимает столь прочную и неизменно эффективную позицию в терапии больных раком молочной железы с позитивным статусом эстрогеновых рецепторов опухоли [1]. Считаем, что открытие в 1996 году нового типа рецепторов — эстрогеновых рецепторов β , которые также являются мишенью тамоксифена, в совокупности с данными об экспрессии этих маркёров в опухолях разных локализаций показывают, что применение тамоксифена в длительном адъювантном режиме должно быть эффективным не только при лечении рака молочной железы. В настоящее время факт экспрессии эстрогеновых рецепторов разных типов в опухолях практически всех известных локализаций и гистологических типов не вызывает сомнения. Отличия существуют лишь в частоте и интен-

сивности экспрессии этих клеточных мишеней тамоксифена [52, 53].

Рассмотренные в настоящем обзоре данные о ключевых точках сигнальных путей и белковых рецепторах клеток, на которые воздействует тамоксифен, показывают, что антиэстроген является уникальным поливалентным таргетным препаратом. Данные о клеточных мишенях тамоксифена, отличных от эстрогеновых рецепторов, суммированы в таблице. Взаимодействие с ними приводит к активации или, наоборот, к ингибированию важнейших биологических процессов, которые контролируют рост опухоли и детерминируют чувствительность к химиотерапии. Видно, что во всех случаях последствия взаимодействия тамоксифена с клетками являются прогностически благоприятными, как с точки зрения торможения роста опухоли и её метастазирования, так и с точки зрения чувствительности к лекарственной терапии. Это чрезвычайно важное «добавление» к антиэстрогенному эффекту тамоксифена.

Считаем, что для полной реализации всех сторон биологической активности тамоксифена при длительной адъювантной терапии злокачественных новообразований разных локализаций, помимо оценки эстрогеновых рецепторов, необходим молекулярно-биологический отбор больных с учётом экспрессии других клеточных мишеней антиэстрогена. Без этого невозможно получить высокий лечебный эффект ни одного таргетного препарата, и тамоксифен в этом смысле не является исключением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jordan V. C. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1: 30—38.
2. Obiorah I., Jordan V. C. Progress in endocrine approaches to the treatment and prevention of breast cancer. *Maturitas* 2011; 70: 4: 315—321.
3. Rohlf C., Blagosklonny M. V., Kyle E. et al. Prostate cancer cell growth inhibition by tamoxifen is associated with inhibition of protein kinase C and induction of p21(waf1/cip1). *Prostate* 1998; 37: 1: 51—59.
4. Cheng A. L., Chuang S. E., Fine R. L. et al. Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C, and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 4: 523—531.

5. Sharif T. R., Sharif M. A novel approach for examining the anti-proliferative effect of protein kinase C inhibitors against human astrocytoma cells. *Int J Oncol* 1998; 13: 4: 685—692.
6. Chen T. C., Su S., Fry D., Liebes L. Combination therapy with irinotecan and protein kinase C inhibitors in malignant glioma. *Cancer* 2003; 97: 9: 2363—2373.
7. Lavie Y., Zhang Z. C., Cao H. T. et al. Tamoxifen induces selective membrane association of protein kinase C epsilon in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998; 77: 6: 928—932.
8. Wang X. Y., Wang Y., Liu H. C. Tamoxifen lowers the MMP-9/TIMP-1 ratio and inhibits the invasion capacity of ER-positive non-small cell lung cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 7: 525—528.

9. Fang Y. J., Pan Z. Z., Li L. R. *et al.* MMP7 expression regulated by endocrine therapy in ERbeta-positive colon cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 132.
10. Hoelting T., Siperstein A. E., Duh Q. Y., Clark O. H. Tamoxifen inhibits growth, migration, and invasion of human follicular and papillary thyroid cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1: 308–313.
11. Matsuoka H., Tsubaki M., Yamazoe Y. *et al.* Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. *Exp Cell Res* 2009; 315: 12: 2022–2032.
12. Xing R. H., Mazar A., Henkin J., Rabbani S. A. Prevention of breast cancer growth, invasion, and metastasis by antiestrogen tamoxifen alone or in combination with urokinase inhibitor B-428. *Cancer Res* 1997; 57: 16: 3585–3593.
13. Ahn S. J., Yoon M. S., Hyuk S. *et al.* Phospholipase C-protein kinase C mediated phospholipase D activation pathway is involved in tamoxifen induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2003; 89: 3: 520–528.
14. Thiantanawat A., Long B. J., Brodie A. M. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003; 63: 22: 8037–8050.
15. Feng Y., Huang J., Ding Y. *et al.* Tamoxifen-induced apoptosis of rat C6 glioma cells via PI3K/Akt, JNK and ERK activation. *Oncol Rep* 2010; 24: 6: 1561–1567.
16. Moodbidri M. S., Shirsat N. V. Activated JNK brings about accelerated apoptosis of Bcl-2-overexpressing C6 glioma cells on treatment with tamoxifen. *J Neurochem* 2005; 92: 1: 1–9.
17. Zhang G. J., Kimijima I., Onda M. *et al.* Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 10: 2971–2977.
18. Hawkin R. A., Arends M. J., Ritchie A. A. *et al.* Tamoxifen increases apoptosis but does not influence markers of proliferation in an MCF-7 xenograft model of breast cancer. *Breast* 2000; 9: 2: 96–106.
19. Salami S., Karami-Tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clin Biochem* 2003; 36: 4: 247–253.
20. Han P., Kang J. H., Li H. L. *et al.* Antiproliferation and apoptosis induced by tamoxifen in human bile duct carcinoma QBC939 cells via upregulated p53 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 2: 251–256.
21. Nazarewicz R. R., Zenebe W. J., Parihar A. *et al.* Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res* 2007; 67: 3: 1282–1290.
22. Nagahara Y., Shiina I., Nakata K. *et al.* Induction of mitochondria-involved apoptosis in estrogen receptor-negative cells by a novel tamoxifen derivative, ridaifen-B. *Cancer Sci* 2008; 99: 3: 608–614.
23. Kallio A., Zheng A., Dahllund J. *et al.* Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 2005; 10: 6: 1395–1410.
24. Bursch W., Ellinger A., Kienzl H. *et al.* Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996; 17: 8: 1595–1607.
25. Bursch W., Hochegger K., Torok L. *et al.* Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 2000; 113: 7: 1189–1198.
26. Bilir A., Altinoz M. A., Erkan M. *et al.* Autophagy and nuclear changes in FM3A breast tumor cells after epirubicin, medroxyprogesterone and tamoxifen treatment *in vitro*. *Pathobiology* 2001; 69: 3: 120–126.
27. Scarlatti F., Bauvy C., Ventruti A. *et al.* Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 18: 18384–18391.
28. Amaravadi R. K., Yu D., Lum J. J. *et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007; 117: 2: 326–336.
29. Nagarkatti N., Davis B. A. Tamoxifen induces apoptosis in Fas+ tumor cells by upregulating the expression of Fas ligand. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 4: 284–290.
30. Lagadee C., Adriaenssens E., Toillon R. A. *et al.* Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 10: 1472–1477.
31. Zulehner N., Maurer M., Węsierska-Gądek J. Effect of anti-estrogen combined with roscovitine, a selective CDK inhibitor, on human breast cancer cells differing in expression of ER. *J Exp Ther Oncol* 2011; 9: 1: 17–25.
32. Węsierska-Gądek J., Gritsch D., Zulehner N. *et al.* Roscovitine, a selective CDK inhibitor, reduces the basal and estrogen-induced phosphorylation of ER- α in human ER-positive breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2011; 112: 3: 761–772.
33. Węsierska-Gądek J., Gritsch D., Zulehner N. *et al.* Interference with ER- α enhances the therapeutic efficacy of the selective CDK inhibitor roscovitine towards ER-positive breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2011; 112: 4: 1103–1117.
34. O'Byrne K. J., Dalglish A. G., Browning M. J. *et al.* The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2: 151–169.
35. Da Silva B. B., da Silva Júnior R. G., Borges U. S. *et al.* Quantification of angiogenesis induced in rabbit cornea by breast carcinoma of women treated with tamoxifen. *J Surg Oncol* 2005; 90: 2: 77–80.
36. Blackwell K. L., Haroon Z. A., Shan S. *et al.* Tamoxifen inhibits angiogenesis in estrogen receptor-negative animal models. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 11: 4359–4364.
37. Cáceres W., González S. Angiogenesis and cancer: recent advances. *P R Health Sci J* 2003; 22: 2: 149–151.
38. Tong S., Chen Q., Shan S. Q. *et al.* Quantitative comparison of the inhibitory effects of GW5638 and tamoxifen on angiogenesis in the cornea pocket assay. *Angiogenesis* 2006; 9: 2: 53–58.
39. Gagliardi A. R., Hennig B., Collins D. C. Antiestrogens inhibit endothelial cell growth stimulated by angiogenic growth factors. *Anticancer Res* 1996; 16: 3A: 1101–1106.
40. Butta A., MacLennan K., Flanders K. C. *et al.* Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer *in vivo* following tamoxifen treatment. *Cancer Res* 1992; 52: 15: 4261–4264.
41. Garvin S., Dabrosin C. Tamoxifen inhibits secretion of vascular endothelial growth factor in breast cancer *in vivo*. *Cancer Res* 2003; 63: 8742–8748.
42. Åberg U. W., Saarinen N., Abrahamsson A. *et al.* Tamoxifen and flaxseed alter angiogenesis regulators in normal human breast tissue *in vivo*. *PLoS One* 2011; 6: 9: e25720.
43. McNamara D. A., Harmey J., Wang J. H. *et al.* Tamoxifen inhibits endothelial cell proliferation and attenuates VEGF-mediated angiogenesis and migration *in vivo*. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 8: 714–718.
44. Lindahl G., Saarinen N., Abrahamsson A., Dabrosin C. Tamoxifen, flaxseed, and the lignan enterolactone increase stroma- and cancer cell-derived IL-1Ra and decrease tumor angiogenesis in estrogen-dependent breast cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 1: 51–60.
45. Hotta T., Tanimura H., Yamaue H. Tamoxifen circumvents the multidrug resistance in fresh human gastrointestinal cancer cells. *J Surg Res* 1996; 66: 1: 31–35.
46. Shen L. Z., Hua Y. B., Yu X. M. Tamoxifen can reverse multidrug resistance of colorectal carcinoma *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7: 1060–1064.
47. Safa A. R., Roberts S., Agresti M., Fine R. L. Tamoxifen aziridine, a novel affinity probe for P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 1: 606–612.
48. Rao U. S., Fine R. L., Scarborough G. A. Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 2: 287–292.
49. Liu Z. H., Ma Y. L., He Y. P. *et al.* Tamoxifen reverses the multi-drug-resistance of an established human cholangiocarcinoma cell line in combined chemotherapeutics. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 3: 1769–1775.
50. Bogush E. A., Ravcheeva A. B., Bogush T. A. *et al.* A new marker of tamoxifen resistance of estrogen receptor-positive breast cancer. *Dokl Biochem Biophys* 2007; 413: 83–87.
51. Bogush T. A., Dudko E. A., Bogush E. A. *et al.* MRP as a new predictive marker of tamoxifen efficiency in treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Dokl Biochem Biophys* 2010; 430: 36–40.
52. Bogush T. A., Dudko E. A., Beme A. A. *et al.* Estrogen receptor expression in tumors different from breast cancer. *Antibiot Khimioter* 2009; 54: 7–8: 41–49.
53. Bogush T. A., Dudko E. A., Beme A. A. *et al.* Estrogen receptors, antiestrogens, and non-small cell lung cancer. *Biochemistry (Mosc)* 2010; 75: 12: 1421–1427.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ВЕК «ОМИКОВ»: ОТ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПРЕССИИ К МЕЖВИДОВЫМ СВЯЗЯМ. ОБЗОР.

ANTIBIOTIC RESEARCH IN THE AGE OF OMICS: FROM EXPRESSION PROFILES TO INTERSPECIES COMMUNICATION / T. WECKE, T. MASCHER* / JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2011; 66: 12: 2689—2704.

Методы изучения физиологии микробов были революционизированы за счёт введения таких инструментов глобального анализа, как сравнительная геномика, методы определения глобальной экспрессии, включая использование микрочипов ДНК (транскриптомика) и двухмерный электрофорез белков в геле (протеомика). С самого начала эти подходы нашли применение и при исследовании антибиотиков. Расшифровка генома была использована для раскрытия биосинтетического потенциала секвенированных бактериальных хромосом и поиска новых мишеней антибиотиков. Выполненные в последние годы многочисленные работы по изучению изменений реакций (откликов) в присутствии антибиотиков на уровне транскриптома и протеома способствовали более глубокому пониманию механизмов действия антибиотиков. Данный обзор сфокусирован на том вкладе, который внесли исследования глобальной экспрессии в изучение антибиотиков на протяжении последнего десятилетия. Исследования по проявлению экспрессии различных генов в отклике на антибиотики привели к более глубокому пониманию механизмов устойчивости бактерий и взаимных связей между стрессовыми откликами. Они помогли также прогнозировать механизм действия новых противомикробных соединений и идентифицировать потенциальные специфичные к антибиотикам биосенсоры. Более того, подобные исследования позволили выявить новые механизмы ингибирования у казалось бы хорошо известных лекарственных препаратов, что может быть полезно при разработке комбинаций лекарств для антибиотикотерапии и определении возможной роли антибиотиков в качестве медиаторов внутриклеточных связей.

* Department of Biology I, Microbiology, Ludwig-Maximilians-University Munich, Großhaderner Str. 2-4, D-82152 Planegg-Martinsried, Germany.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛАСТЕРА БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА WAP-8294A2 ИЗ *LYSOBACTER ENZYMOGENES* OH11, АКТИВНОЙ В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE ANTI-METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WAP-8294A2 BIOSYNTHETIC GENE CLUSTER FROM *LYSOBACTER ENZYMOGENES* OH11 / W. ZHANG, Y. LI, G. QIAN, Y. WANG, H. CHEN, Y.-Z. LI, F. LIU, Y. SHEN**, L. DU* // ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 2011; 55: 5581—5589.

Lysobacter enzymogenes штамм OH11 проявляет биологическую активность при грибковых и бактериальных заболеваниях. Недавно было завершено секвенирование его генома и определено большое число генных кластеров, предположительно ответственных за биосинтез нерибосомальных пептидов и поликетидов, включая ранее идентифицированное противогрибковое соединение дигидромальтофилин (HSAF). Один из генных кластеров содержал две крупные открытые считывающие рамки, совместно кодирующие 12 модулей нерибосомальных пептидных синтетаз (НРПС). Дезинтеграция генов одной из НРПС привела к исчезновению метаболита, образуемого диким штаммом, и ограничению антибактериальной активности. Дезинтеграция некоторых фланкирующих генов также влияла на образование метаболита и антибактериальную активность. Выделенный метаболит был подвергнут спектроскопическому анализу. Данные масс-спектрометрии и ЯМР показали его идентичность химической структуре циклического липодепсипептида WAP-8294A2, высокоактивного в отношении метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA), находящегося на I/II фазе клинических испытаний. Ранее биосинтетические гены WAP-8294A2 не были описаны. До настоящего времени основными источниками антибиотиков служили грамположительные стрептомицеты. Грамотрицательные водно-почвенные бактерии рода *Lysobacter*, поддающиеся генетической модификации не были в достаточной степени изучены. WAP-8294A2 синтетаза представляет собой самый большой комплекс НРПС, состоящий из 45 функциональных доменов. Идентификация этих генов составляет основу изучения механизма биосинтеза WAP-8294A2 и открывает новый биоинженерный путь образования анти-MRSA антибиотиков на основе *Lysobacter*.

*Department of Chemistry, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska 68588.

**School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China.

НОВАЯ РОЛЬ ЭФФЕКТОРА ДИСУЛЬФИДНОГО СТРЕССА γ BN В ПРОЯВЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* К β -ЛАКТАМАМ.

NEW ROLE OF THE DISULFIDE STRESS EFFECTOR YjbH IN β -LACTAM SUSCEPTIBILITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / N. GÖHRING, I. FEDTKE, G. XIA, A. M. JORGE, M. G. PINHO, U. BERTSCHE, A. PESCHEL* / *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 2011; 55: 5452—5458.

Staphylococcus aureus подвергается воздействию многочисленных антимикробных соединений, включая продукты окисления и антибиотики. Различные механизмы и пути регуляции, управляющие чувствительностью или устойчивостью, сложны и недостаточно понятны. Как было ранее показано, откликом *Bacillus subtilis* на дисульфидный стресс является тиоредоксиноподобный белок YjbH, который связывается с регулятором транскрипции Srx и контролирует его деградацию посредством протеасомо-подобной протеазы ClpXP. Авторы продемонстрировали, что у *S. aureus* гомолог YjbH играет сходную роль в проявлении чувствительности к диамиду, продукту дисульфидного стресса, аналогичному таковому у *B. subtilis*, и что для активности необходимы цистеиновые остатки YjbH. Инактивация YjbH приводила к умеренной устойчивости к оксацилину и другим бета-лактамам антибиотикам, подобное изменение фенотипа было связано с повышенным уровнем ПСБ4 и увеличением перекрёстных сшивок в пептидогликане. Влияние YjbH на чувствительность к бета-лактамам сохранялось даже при мутациях в 4 цистеиновых остатках в YjbH. Это означало, что его роль в дисульфидном стрессе и бета-лактамной устойчивости основана на различных видах взаимодействий. Возможно, что ClpXP как адаптор YjbH имеет больше белковых мишеней, чем предполагалось раньше, и что механизмы окислительного стресса и устойчивости к бета-лактамам тесно связаны между собой.

* Cellular and Molecular Microbiology, Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine, University of Tübingen, Elfriede-Aulhorn-Straße 6, 72076 Tübingen, Germany.

АНТИСТАФИЛОКОККОВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ФТОРХИНОЛОНА JNJ-Q2.

ANTISTAPHYLOCOCCAL ACTIVITIES OF THE NEW FLUOROQUINOLONE JNJ-Q2 / B. J. MORROW*, D. ABBANAT, E. Z. BAUM, S. M. CRESPO-CARBONE, T. A. DAVIES, W. HE, W. SHANG, A. M. QUEENAN, A. S. LYNCH // *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 2011; 55: 5512—5521.

Новый фторхинолон широкого спектра действия, JNJ-Q2, проявил *in vitro* активность в отношении грамотрицательных и грамположительных мик-

роорганизмов, включая метициллиноустойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA) и устойчивые к ципрофлоксацину штаммы MRSA. Тестирование на изогенных чувствительных к метициллину *S. aureus* (MSSA) и MRSA штаммах, полученных в результате мутаций в области специфических мишеней, показало, что значения МПК для JNJ-Q2 были $\leq 0,12$ мкг/мл, что в 16—32 раза ниже значений МПК моксифлоксацина. Сверхэкспрессия помпового выброса NorA не влияла на значение МПК JNJ-Q2. Ингибирование ДНК гиразы и ДНК топоизомеразы IV *S. aureus* показало, что JNJ-Q2 был в равной степени активнее антибиотиков сравнения как в отношении ферментов дикого типа, так и ферментов, имеющих аминокислотные замещения, приводящие к устойчивости. В сравнительных опытах по селекции устойчивости в параллельных серийных пассажах MRSA культур с ципрофлоксацином и JNJ-Q2 было показано, что ципрофлоксацин селекционировал мутанты с МПК 128—512 мкг/мл в период 18—24 дней пассажей. У культур, подвергшихся пассажам с JNJ-Q2, значения МПК сохранялись на уровне ≤ 1 мкг/мл как минимум через 27 дней серийных пассажей. Мутанты со значениями МПК JNJ-Q2, равными 4 мкг/мл, не наблюдались даже через 33 дня пассажей. Характеристика мутантов показала, что культуры, прошедшие пассажи с ципрофлоксацином и имеющие МПК в интервале от 256 до 512 мкг/мл, имели только 2 или 3 мутации в области устойчивости к хинолонам (QRDR). Культуры, подвергнутые пассажам с JNJ-Q2 в течение 51 дня и имеющие МПК от 1 до 64 мкг/мл, содержали от 4 до 9 мутаций в области мишени. В образованных *in vitro* биоплёнках дикого и устойчивого к ципрофлоксацину MRSA штаммов при экспозиции с JNJ-Q2 наблюдали большее снижение числа бактерий (в течение 7-дневной экспозиции снижение составило от 4,5 до $>7 \log_{10}$ КОЕ), чем в биоплёнках, обработанных ципрофлоксацином, моксифлоксацином, рифампином или ванкомицином.

* Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development, L. L. C., Raritan, New Jersey.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ФТОРХИНОЛОНА, JNJ-Q2, НА МОДЕЛЯХ КОЖНЫХ, РЕСПИРАТОРНЫХ И СИСТЕМНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*.

EFFICACY OF A NEW FLUOROQUINOLONE, JNJ-Q2, IN MURINE MODELS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SKIN, RESPIRATORY, AND SYSTEMIC INFECTIONS // J. FERNANDEZ*, J. J. HILLIARD, B. J. MORROW,

J. L. MELTON, R. K. FLAMM, A. M. BARRON,
A. S. LYNCH // **ANTIMICROB AGENTS
CHEMOTHER** 2011; 55: 5522— 5528.

In vivo эффективность JNJ-Q2, нового фторхинолона широкого спектра действия, оценивали на модели септицемии, обусловленной метициллиночувствительным (MSSA) и метициллиноустойчивым (MRSA) штаммами *Staphylococcus aureus*, на модельной инфекции нижних дыхательных путей у мышей, вызванной *Streptococcus pneumoniae*. JNJ-Q2 и антибиотики сравнения также оценивали на модели острой кожной инфекции у мышей, вызванной внебольничным MRSA штаммом, и на модели внутрибольничной кожной инфекции (вБКИ) у мышей, используя клинический штамм, для которого также была выявлена селекция устойчивых мутантов. На модели MSSA септицемии JNJ-Q2 демонстрировал активность, сравнимую с активностью моксифлоксацина 50% эффективная доза JNJ-Q2 [ED₅₀] составила 0,2 мг/кг массы тела при введении подкожно, и 2 мг/кг — при пероральном), а на модели MRSA септицемии активность его превосходила активность ванкомицина: для JNJ-Q2 величина ED₅₀ составила 1,6 мг/кг. На модельной *S. pneumoniae* инфекции нижних дыхательных путей ED₅₀ JNJ-Q2 составила 1,9 мг/кг подкожно и 7,4 мг/кг *per os*, была сопоставима с активностью гемифлоксацина и превосходила активность моксифлоксацина. На обеих моделях MRSA кожных инфекций лечение JNJ-Q2 приводило к дозозависимому снижению бактериального титра на коже, причём эффект каждой дозы JNJ-Q2 превосходил эффект антибиотиков сравнения: ципрофлоксацина, моксифлоксацина, линезолида и ванкомицина. Кроме того, на вБКИ модели JNJ-Q2 показал меньшую способность селекционировать устойчивость к ципрофлоксацину, чем в случае ципрофлоксацина и моксифлоксацина. Таким образом, JNJ-Q2 продемонстрировал активность, сравнимую или превосходящую активность фторхинолоновых и антистафилококковых антибиотиков сравнения на некоторых локальных или системных модельных инфекциях кожи, вызванных *S. aureus*, и *S. pneumoniae*, и в настоящее время проходит оценку в клинических испытаниях II фазы.

* Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L. L. C., Raritan, New Jersey.

КАРБАПЕНЕМЫ: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ. ОБЗОР.

CARBAPENEMS: PAST, PRESENT, AND FUTURE / K. M. PAPP-WALLACE, A. ENDIMIANI, M. A. TARACILA, R. A. BONOMO* // **ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER** 2011; 55: 4943— 4960.

В обзоре суммированы данные о современном состоянии группы карбапенемных антибиотиков и их роли в антибактериальном арсенале. Среди используемых в настоящее время беталактамов карбапенемы занимают уникальное место, благодаря их относительной устойчивости к гидролитическому действию большинства бета-лактамаз. В некоторых случаях они действуют как «замедленные» субстраты или ингибиторы бета-лактамаз, их мишенью являются пенициллиносвязывающие белки. Это дополнительное свойство — подавлять бета-лактамазы, является основной причиной для расширения данного класса беталактамов. Приведены сведения об открытии и развитии семейства карбапенемов. Из первых описанных карбапенемов наибольшей антибиотической активностью обладал тиенамицин, который стал прародителем всех последующих карбапенемов. К настоящему времени в литературе известно более 80 соединений с улучшенными антибиотическими свойствами по сравнению с тиенамицином. В обзоре представлены также такие важные карбапенемы, используемые в клинической практике, как имипенем-циластатин, меропенем, эртапенем, дорипенем, панипенем-бетамипрон и биапенем. В заключении выделены основные проблемы и подчеркнута необходимость продолжать развитие этой группы разнообразных и активных соединений, служащих здравоохранению более 3-х десятилетий.

* Departments of Medicine, Pharmacology, Molecular Biology and Microbiology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАБОТКИ ТОМОПЕНЕМОМ (CS-023) В ДОЗАХ, ИМИТИРУЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИЕ, НА МОДЕЛЯХ ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* У МЫШЕЙ.

EFFICACY OF HUMAN-SIMULATED EXPOSURES OF TOMOPENEM (FORMERLY CS-023) IN A MURINE MODEL OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* INFECTION / K. SUGIHARA*, K. TATEDA, N. YAMAMURA, T. KOGA, C. SUGIHARA, K. YAMAGUCHI // **ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER** 2011; 55: 5004— 5009.

Томопенем (первоначально CS-023) — новый карбапенем с повышенной активностью в отношении разнообразных внутрибольничных патогенов, в т. ч. *Pseudomonas aeruginosa* и метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA), с периодом полувыведения, вдвое превышающим

таковой имипенема и меропенема. Задачей исследования было оценить клиническую эффективность экспозиций с томопеном, имитирующих клинические, на модели инфекции бедра у мышей, обусловленной 9 клиническими штаммами *P.aeruginosa* с МПК от 4 до 32 мкг/мл и 9 клиническими штаммами MRSA с МПК от 4 до 16 мкг/мл. Имитационный режим дозирования для нейтропенических мышей был спланирован таким образом, чтобы приблизить совокупный уровень 24-часового периода к концентрации свободного лекарства, превышающей значение МПК в стационарной фармакокинетической фазе ($f\%T_{\text{МПК}}$), что наблюдается при введении томопена человеку в дозах 750 и 1500 мг в виде 0,5-часовой инфузии трижды в день (TID). Как сообщалось ранее, различий между значениями бактериальной нагрузки *P.aeruginosa* и MRSA для проявления эффективности не было. Томопенем в дозе 750 мг оказывал бактерицидное или бактериостатическое действие на 10 из 11 штаммов *P.aeruginosa* и MRSA с МПК ≤ 8 мкг/мл ($f\%T_{\text{МПК}} \geq 41$), а в дозе 1500 мг бактерицидный эффект был отмечен у 16 из 17 штаммов *P.aeruginosa* и MRSA с МПК ≤ 16 мкг/мл ($f\%T_{\text{МПК}} \geq 43$). В сравнительных опытах меропенем в дозе 1000 мг TID был бактерициден или бактериостатичен только для 3 из 4 штаммов *P.aeruginosa* с МПК ≤ 4 мкг/мл ($f\%T_{\text{МПК}} \geq 33$). На основании этих результатов можно ожидать, что томопеном в дозах 750 TID при значении $f\%T_{\text{МПК}}$ выше 40 будет эффективен в отношении штаммов *P.aeruginosa* и MRSA с МПК ≤ 8 мкг/мл, а в дозах 1500 мг TID — в отношении штаммов с МПК ≤ 16 мкг/мл.

* Biologics Research Laboratories, Daiichi Sankyo Co., Ltd., 16-13, 1-Chome Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan.

ПРИГОДНОСТЬ НОВОЙ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АМИНОСТЕРОЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ В ВИДЕ АЭРОЗОЛЯ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ.

SUITABILITY OF A NEW ANTIMICROBIAL AMINOSTEROL FORMULATION FOR AEROSOL DELIVERY IN CYSTIC FIBROSIS / K. ALHANOUT, J. M. BRUNEL, J. C. DUBUS, J. M. ROLAIN, V. ANDRIEU* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2011; 66: 12: 2797—2800.

Производное аминостерола (ПАС), обладающее *in vitro* антимикробной активностью в отношении различных патогенов, вызывающих лёгочные инфекции у больных муковисцидозом, было испытано для оценки возможности применения его растворов (2 и 10 мг/мл) в аэрозольной форме с применением Pari LC Plus и eFlow небулайзеров и

сравнения со стандартным раствором тобрамицина. Были определены физико-химические свойства растворов ПАС, включая pH и осмолярность, выполнен лазерно-дифракционный анализ распределения размеров частиц. Влияние муцина на *in vitro* антибактериальную активность растворов ПАС и тобрамицина оценивали определением МПК методом разведений в бульоне. Значения МПК тобрамицина и ПАС составляли, соответственно, для *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278534 и 1 мл/л, для *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 — 1 и 0,5 мг/л. После добавления муцина в количестве 1 и 10 мг/мл величина МПК тобрамицина возрастала в 4 и 16 раз соответственно, тогда как МПК ПАС оставалась неизменной. Для получения изотонических растворов ПАС их готовили в 0,9% растворе NaCl, добавляя NaOH до желаемого значения pH. Растворы ПАС успешно распылялись небулайзерами и соответствовали аэродинамическим параметрам растворов тобрамицина. Результаты данных предварительных исследований продемонстрировали возможность применения ПАС в аэрозольной форме, и дальнейшая оценка лекарственной формы будет проведена на моделях лёгочной инфекции у животных.

* URMITE UMR 6236, CNRS-IRD, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

БАКТЕРИОФАГИ КАК НОСИТЕЛИ «РЕЗИСТОМЫ» ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ.

BACTERIOPHAGES AS VEHICLES OF THE RESISTOME IN CYSTIC FIBROSIS / J. M. ROLAIN*, L. FANCELLO, C. DESNUES, D. RAOULT // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2011; 66: 11: 2444—2447.

Микробные сообщества окружающей среды и микробиота человека представляют собой огромный резервуар мобильных генов, т. н. «мобиомы», включая пул генов, кодирующих устойчивость к антибиотикам, т. н. «резистомы». Секвенирование целого генома у бактерий, выделенных от больных муковисцидозом (МВ), показало, что бактериофаги вносят значительный вклад в изменение бактериального генома, а метагеномный анализ ДНК вирусных сообществ из дыхательных путей больных МВ выявил наличие в бактериофагах генов, кодирующих антибиотикоустойчивость. Дыхательные пути больных МВ следует рассматривать как сложную микробиоту, где бактериофаги являются носителями механизмов адаптации микробов к специфической среде, а также возникновению и селекции бактерий со множественной лекарственной устойчивостью и

химерным репертуаром (необычном сочетании механизмов устойчивости). Известно, что фаги могут распространяться в период хронической инфекции лёгких у больных МВ, поэтому особенно важно углублять понимание механизмов индукции фагов, чтобы предотвращать распространение детерминант вирулентности и/или антибиотикоустойчивости как внутри МВ популяции, так и среди населения. Подобная современная точка зрения может быть полезна для будущей клинической практики, поскольку применение руководств по современной антибиотикотерапии, в контакте с МВ, может приводить к появлению генов антибиотикоустойчивости.

* URMITE, CNRS-IRD UMR 6236, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ «ОСТРОВКОВ» УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗИДИЕВОЙ КИСЛОТЕ, ОПОСРЕДОВАННОЙ *fusB*, У *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*.

IDENTIFICATION OF *fusB*-MEDIATED FUSIDIC ACID RESISTANCE ISLANDS IN *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ISOLATES / H.-J. CHEN, J.-C. TSAI, W.-C. HUNG, S.-P. TSENG, P.-R. HSUEH, L.-J. TENG* // *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 2011; 55: 5842—5849.

Для понимания высокой распространённости *fusB* генов среди устойчивых к фузидиевой кислоте (ФК) *Staphylococcus epidermidis* был проведён анализ элементов устойчивости у 34 штаммов. Секвенс-анализ области *aj1*-LP-*fusB* показал, что существует, по крайней мере, 3 её типа. Тип 1 содержал полностью *aj1*-, тип 2 — частично усечённую с 93 по 421 положение нуклеотида *aj1*, тип 3 имел ещё более усечённую *aj1*, представленную последними 37 тпн. Штаммы с *aj1* 1 и 2 типов характеризовались слегка повышенным уровнем устойчивости к ФК (МПК 8—32 мкг/мл) по сравнению со штаммами 3-го типа (МПК 4—16 мкг/мл). Последующее секвенирование фланкирующих регионов *fusB* у 4 отобранных штаммов, несущих различные типы *aj1*-LP-*fusB*, установило, что *fusB* гены были локализованы на «островках» устойчивости (ОУ), связанных с фагами и относящихся к $\text{SeRI}_{fusB-2793}$, $\text{SeRI}_{fusB-704}$, $\text{SeRI}_{fusB-5907}$, $\text{SeRI}_{fusB-7778}$ соответственно. Три из этих ОУ ($\text{SeRI}_{fusB-2793}$, $\text{SeRI}_{fusB-704}$, $\text{SeRI}_{fusB-5907}$) были локализованы в 5'-3' направлении *groEL* (соответствует положению 44-min полной геномной последовательности *Staphylococcus aureus*), один ОУ ($\text{SeRI}_{fusB-7778}$) был локализован в 5'-3' направлении *rpsR* (соответствует положению 8-min). Все ОУ были вставлены в интегразораспознаваемые *att* сайты. У большинства из 34 штаммов инсерцион-

ные сайты *fusB* — ОУ чаще были локализованы в 5'-3' *groEL*, у 2 штаммов — в 5'-3' *rpsR*, у 4 штаммов они не были идентифицированы. Распределение пульсо-типов показало, что *fusB*-содержащие штаммы *S.epidermidis* были гетерогенными. Таким образом, детерминанта устойчивости *fusB* у *S.epidermidis* тесно ассоциируется с связанными с фагами ОУ, о чём впервые сообщает в данной статье.

* Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology, National Taiwan University College of Medicine; Department of Laboratory Medicine, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ КЛИНИЧЕСКИМИ ИСХОДАМИ И *IN VITRO* ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ У БОЛЬНЫХ С ОСЛОЖНЁННЫМИ ИНТРААБДОМИНАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ, ЛЕЧЕННЫХ МОКСИФЛОКСАЦИНОМ.

CLINICAL EFFICACY AND CORRELATION OF CLINICAL OUTCOMES WITH *IN VITRO* SUSCEPTIBILITY FOR ANAEROBIC BACTERIA IN PATIENTS WITH COMPLICATED INTRAABDOMINAL INFECTIONS TREATED WITH MOXIFLOXACIN / E. J. C. GOLDSTEIN*, J. S. SOLOMKIN, D. M. CITRON, J. D. ALDER // *CLINICAL INFECTIOUS DISEASES* 2011; 53: 11: 1074—1080.

Адекватная антимикробная терапия улучшает показатель клинических исходов при осложнённых интраабдоминальных инфекциях (оИАИ). В *in vitro* исследованиях последнего времени сообщается о росте устойчивости *Bacteroides* species к моксифлоксацину вследствие его эмпирического применения при инфекциях, вызванных данными микроорганизмами. В обобщённом анализе 4 рандомизированных клинических испытаний (2000—2010) была оценена сравнительная эффективность моксифлоксацина при оИАИ, в т. ч. обусловленных анаэробными микроорганизмами. Популяция первоначально отобранных больных включала 1209 человек, получавших моксифлоксацин (из них 745 с микробиологически подтверждённым возбудителем), и 1193 (741 с микробиологически подтверждённым возбудителем) человека, получавших антибиотики сравнения. Показатель успешного клинического исхода, согласно протоколу, составил 85,6% (817 из 955) в группе моксифлоксацина и 87,8% (860 из 979) в группе сравнения. Из 642 культур анаэробов, выделенных до терапии у больных из «моксифлоксациновой» группы, 561 (87,4%) была чувствительна, МПК ≤2 мг/л; 34 (5,3%) имели умеренную чувствительность, МПК штаммов 4 мг/л;

и 47 (7,3%) были устойчивы, МПК ≥ 8 мг/л. Подобный же уровень клинического исхода с моксифлоксацином был достигнут в отношении всех анаэробов, включая выделенные от больных, инфицированных *Bacteroides fragilis* (158 (82,7%) из 191 больных), *Bacteroides thetaiotaomicron* (74 (82,2%) из 90 больных) и *Clostridium species* (37 (80,4%) из 46 больных). Общий положительный показатель клинического исхода для всех анаэробов составил 82,3%. Обобщённый для всех анаэробов уровень положительного исхода лечения моксифлоксацином в зависимости от значения МПК выглядел следующим образом: 83,1% (466 из 561 больных) — МПК ≤ 2 мг/л; 91,2% (31 из 34 больных) — МПК 4 мг/л; 82,4% (14 из 17 больных) — МПК 8 мг/л; 83,3% (5 из 6 больных) — МПК 16 мг/л и 66,7% (16 из 24 больных) — МПК ≥ 32 мг/л. Таким образом, моксифлоксацин продемонстрировал клиническую эффективность при ИАИ, обусловленных как анаэробными, так и аэробными штаммами. Более 87% основных возбудителей ИАИ были чувствительны к моксифлоксацину; и эффективность моксифлоксацина была обусловлена повышением общепринятого пограничного значения МПК ≤ 2 мг/л для большинства анаэробов.

* R. M. Alden Research Laboratory, 2021 Santa Monica Blvd, Ste 740 East, Santa Monica, CA 90404.

ВЛИЯНИЕ ТЕЛАВАНЦИНА НА КИШЕЧНУЮ МИКРОФЛОРУ ЧЕЛОВЕКА.

EFFECT OF TELAVANCIN ON HUMAN INTESTINAL MICROFLORA / M.-U. RASHID, A. WEINTRAUB, C. ERIK NORD* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2011; 38: 6: 474—479.

Телаванцин — новый липогликопептидный антибиотик с двойным механизмом действия: подавление синтеза клеточной стенки и разрушение плазматической мембраны бактерий — применяют при лечении грамположительных инфекций. Целью работы было изучение влияния телаванцина на кишечную микрофлору человека. Тринадцать добровольцев (6 мужчин и 7 женщин в возрасте 18—40 лет) получали телаванцин в дозе 10 мг/кг веса тела, в виде 60-минутной в/в инфузии каждые 24 ч в течение 7 дней. Пробы плазмы и мочи отбирали на 5, 6 и 7 сутки для анализа фармакокинетики телаванцина. Пробы фекалий отбирали перед приёмом и на 2, 5, 7, 9, 14 и 21 сутки после начала лечения, и высевы культивировали на неселективной и селективной средах. После подсчёта колоний разного типа, выделяли их в виде чистых культур и определяли количественный состав различных родов бактерий. Определяемых концентраций телаван-

цина в фекалиях обнаружено не было. На протяжении всего периода исследования наблюдали незначительное влияние препарата на количество Enterobacteriaceae, энтерококков, *Candida albicans*, бифидобактерий, лактобактерий, клостридий и *Bacteroides* spp. Штаммов *Clostridium difficile* и токсинов не выявлено. Также не было установлено колонизации новыми грамположительными бактериями с МПК телаванцина ≥ 2 мг/л. На основании полученных микробиологических данных можно сделать вывод о том, что телаванцин не оказывает существенного экологического влияния на кишечную микрофлору человека.

* Department of Laboratory Medicine, Karolinska University Hospital, Karolinska Institutet, SE-141 86 Stockholm, Sweden.

IN VITRO И IN VIVO АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ТИОПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФАКТОРА ПРОЛОНГАЦИИ Tu

IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITIES OF NOVEL, SEMISYNTHETIC THIOPEPTIDE INHIBITORS OF BACTERIAL ELONGATION FACTOR Tu // J.A. LEEDS*, M. J. LAMARCHE, J. T. BREWER, S. M. BUSHELL, G. DENG, J. M. DEWHURST, J. DZINK-FOX, E. GANGL, A. JAIN, L. LEE, M. LILLY, K. MANNI, S. MULLIN, G. NECKERMANN, C. OSBORNE, D. PALESTRANT, M. A. PATANE, A. RAIMONDI, S. RANJITKAR, E. M. RANN, M. SACHDEVA, J. SHAO, S. TIAMFOOK, L. WHITEHEAD, D. YU // ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 2011; 55: 5277—5283.

Идентифицированы два новых полусинтетических производных, действие которых, подобно исходному соединению, GE2270A, нацелено на бактериальный фактор пролонгации Tu (EF-Tu) протеинов. Производные циклоалкилкарбоновой кислоты были активны в отношении трудно поддающихся лечению грамположительных патогенов и обладали повышенной растворимостью в воде по сравнению с GE2270A. В сравнительных исследованиях с обычно применяемыми антибиотиками соединения 1 и 2 были высокоактивны в отношении клинических штаммов метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* и ванкомициноустойчивых энтерококков (МПК₉₀ $\leq 0,25$ мкг/мл), но менее активны в отношении стрептококков (МПК₉₀ ≥ 4 мкг/мл). Как и GE2270A, соединения 1 и 2 подавляли синтез белка у бактерий и селекционировали спонтанную утрату чувствительности посредством мутаций в гене *tuf*, кодирующем EF-Tu. Перекрёстной устойчивости к антибиотикам других классов у мутантов не было. На модели системной инфекции у мышей соединения 1 и 2 в

50% эффективных дозах (ED_{50}), равных соответственно 5,2 и 4,3 мг/кг, защищали животных при летальных *S.aureus* инфекциях. Подобным образом соединения 1 и 2 защищали мышей при летальных системных *E.faecalis* инфекций: ED_{50} , составили 0,56 и 0,23 мг/кг соответственно. Таким образом, соединения 1 и 2 проявили *in vitro* и *in vivo* активность в случаях трудно поддающихся лечению инфекций и представляют новый перспективный класс антибиотиков для медицины.

* Novartis Institutes for Biomedical Research, Infectious Disease Area, Cambridge, Massachusetts 02139.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДНОГО АНТИБИОТИКА WLBU2 В КОМБИНАЦИИ С БИОДЕГРАДИРУЕМЫМ ПОЛИМЕРОМ.

BIOACTIVITY OF WLBU2 PEPTIDE ANTIBIOTIC IN COMBINATION WITH BIOERODIBLE POLYMER / J. R. MCCLANAHAN, R. PEYYALA, R. MAHAJAN, R. C. MONTELARO, K. F. NOVAK, D. A. PULEO* / INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2011; 38: 6 530—533.

WLBU2 — пептидный антибиотик, обладающий широким спектром антимикробной активности, в т. ч. в отношении бактерий, ассоциирующихся с заболеваниями периодонта. Хотя периодонтит обусловлен различными системными причинами, от сердечно-сосудистых заболеваний до преждевременных родов, для эрадикации источника инфекции необходима местная терапия. Для возможности локального обеспечения контроля за степенью и скоростью высвобождения лекарства часто используют биodeградируемые полимеры. В настоящем исследовании была использована биodeградируемая композиция фталата ацетата целлюлозы (ФАЦ) и Pluronic® F-127 (PF-127) с WLBU2. Антимикробную активность собственно ФАЦ/PF-127 и комбинации полимера с WLBU2 определяли с *Streptococcus gordonii*, видом, участвующим в ранней колонизации поверхности зубов. Полимерная плёнка оказывала дозозависимый бактериостатический эффект, снижая число колоний на ≥ 2 log при самых высоких концентрациях, вероятно, благодаря гидрофобности ФАЦ, способствующей разрушению поверхности бактерий. Комбинация WLBU2 с ФАЦ/PF-127 имела значительно сниженную активность по сравнению со свободным антибиотиком, оказывающим, как все катионные антибиотики, дестабилизирующее действие на бактериальную мембрану. Лекарственная форма с сахарозой в качестве наполнителя восстанавливала бактерицидную активность пептидного антибиотика за счёт снижения взаимо-

действия с полимером, что выражалось в уменьшении числа колоний *S.gordonii* на >3 log. Таким образом, с помощью ФАЦ/PF-127 в качестве носителя WLBU2 можно доставлять в определённое место, при этом бактерицидная активность антибиотика доминирует над бактериостатическим действием полимера.

* Center for Biomedical Engineering, University of Kentucky, Lexington, KY, USA.

IN VITRO АКТИВНОСТЬ ДАПТОМИЦИНА, ВАНКОМИЦИНА И ТЕЙКОПЛАНИНА, ЗАКЛЮЧЁННЫХ В ПОЛИМЕТИЛМЕТАКРИЛАТ, В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ, МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫХ И УМЕРЕННО УСТОЙЧИВЫХ К ВАНКОМИЦИНУ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

IN VITRO ACTIVITIES OF DAPTOMYCIN-, VANCOMYCIN-, AND TEICOPLANIN-LOADED POLYMETHYLMETHACRYLATE AGAINST METHICILLIN-SUSCEPTIBLE, METHICILLIN-RESISTANT, AND VANCOMYCIN-INTERMEDIATE STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / Y. CHANG*, W.-C. CHEN, P.-H. HSIEH, D. W. CHEN, M. S. LEE, H.-N. SHIH, S. W. N. UENG // ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 2011; 55: 5480—5484.

Задача исследования состояла в оценке антибиотического действия костных полиметилметакрилатных (ПММА) цементов, содержащих даптомицин, ванкомицин и тейкопланин, в отношении штаммов метициллиночувствительного *Staphylococcus aureus* (MSSA), метициллиноустойчивого *S.aureus* (MRSA) и умеренно устойчивого к ванкомицину *S.aureus* (VISA). Стандартные образцы цемента содержали на 40 г ПММА 1 г (низкая доза), 4 г (средняя доза) или 8 г (высокая доза) антибиотиков. Определяли характер элюции и антибиотическую активность образцов. Характер высвобождения антибиотиков из образцов цемента оценивали по элюции в бульон *in vitro* методом ВЭЖХ. Определяли активность элюатов в отношении штаммов MSSA, MRSA и VISA. Активность всех антибиотиков после смешения их с ПММА сохранялась. Период элюции из цемента, «нагруженного» более высокими дозами антибиотиков, был более продолжительным. Независимо от дозы препарата цементы с тейкоплатином показали более эффективную элюцию и более продолжительный период ингибирования MSSA, MRSA и VISA, чем цементы с включёнными в них такими же дозами даптомицина и ванкомицина. По антибиотическому эффекту в отношении *S.aureus*

инфекции цементы, содержащие тейкоплагин, превосходили образцы цементов с другими антибиотиками.

* College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan.

**УСИЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ВАНКОМИЦИНА
В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЁНОК ЗА СЧЁТ
УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДЕСТРУКЦИИ
МИКРОПУЗЫРЬКАМИ.**

**ENHANCEMENT OF VANCOMYCIN ACTIVITY AGAINST
BIOFILMS BY USING ULTRASOUND-TARGETED
MICROBUBBLE DESTRUCTION / N. HE, J. HU, H. LIU,
T. ZHU, B. HUANG, X. WANG, Y. WU, W. WANG*,
D. QU** //ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER
2011; 55: 5331—5337.**

Лечение инфекций, сопровождающихся образованием биоплёнок на имплантируемых медицинских аппаратах, очень трудное, даже при экстенсивной антибиотикотерапии. Задачей исследования было определить возможность усиления активности ванкомицина в отношении биоплёнок, образуемых *Staphylococcus epidermidis* RP62A, целенаправленной ультразвуковой деструкцией биоплёнки микропузырьками (ЦУДМ). Биоплёнки в возрасте 24 час. обрабатывали ванкомицином в сочетании с ЦУДМ. В опытах *in vitro*. концентрация ванкоми-

цина составляла 100 мкг/мл, концентрация микропузырьков (SonoVue) — 30% (об/об). После экспозиции ультразвуком (0,08 МГц, 1,0 W/см², 50% циклов, 10 мин. продолжительность) плёнки культивировали при 37°C в течение 12 час. Было показано, что в биоплёнках, обработанных ванкомицином в комбинации с ЦУДМ, были многочисленные микропоры. Плотность биоплёнок (A_{570} значения) и число жизнеспособных клеток *S.epidermidis* в них было существенно уменьшено по сравнению с другими группами. Более того, конфокальной лазерной сканирующей микроскопией был выявлен большой процент соотношения мёртвых клеток. На *in vivo* модели у кролика по числу жизнеспособных клеток в биоплёнках также было показано усиление действия ванкомицина в сочетании с ЦУДМ. Ультразвуковая деструкция микропузырьками может значительно улучшить активность антибиотиков в отношении инфекций, сопровождающихся образованием биоплёнок.

* Department of Ultrasound, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China.

** Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministry of Education and Ministry of Public Health, Institute of Medical Microbiology and Institutes of Biomedical Sciences, Medical School of Fudan University, Shanghai, China.

Материал подготовлен Бондаревой Н. С.

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ЦИКЛОФЕРОН®

мы создаем
УНИКАЛЬНОЕ



www.polysan.ru



ЩИТ
И МЕЧ
ИММУННОЙ
ЗАЩИТЫ

- Первый российский низкомолекулярный индуктор интерферона
- Оригинальный механизм фармакологического действия
- Безопасность, надежность и доказанная эффективность
- Идеальная совместимость
- Производится в соответствии с международным стандартом качества GMP

Показания к применению:

Таблетки

(Reg№ 001049/02):
вирусные инфекции
(грипп, ОРЗ, гепатиты, герпес),
кишечные инфекции,
нейроинфекции

Инъекции

(Reg№ 001049/03):
вирусные инфекции,
заболевания передаваемые
половым путем, кишечные
инфекции, нейроинфекции

Линимент

(Reg№ 001049/01):
уретриты, баланопоститы,
вагиниты, стоматиты,
пародонтиты



Форма выпуска: раствор для инъекций
125 мг/мл в ампулах по 2 мл №5;
таблетки по 0,15 г, покрытые
кишечнорастворимой оболочкой;
линимент 5% тубы по 5 мл и 30 мл

ГЕРПЕС И ЦИТОМЕГАЛИЯ
ВИРУСНЫЕ ГЕПАТИТЫ В, С, D
ХЛАМИДИОЗ, МИКОПЛАЗМОЗ
УРЕАПЛАЗМОЗ
УРОГЕНИТАЛЬНЫЕ И
БРОНХОЛЕГОЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ
ПИЕЛОНЕФРИТ
ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ
ДИСБАКТЕРИОЗ
ЭНДОМЕТРИОЗ И
ВУЛЬВОВАГИНИТ
МЕНИНГИТЫ
КАНДИДОЗ
ГРИПП И ОРВИ



суппозитории мазь и гель ВИФЕРОН®

ИНТЕРФЕРОН ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ АЛЬФА-2
С АНТИОКСИДАНТНЫМ КОМПЛЕКСОМ

- Препарат разрешен к применению у беременных женщин и новорожденных детей
- Не вызывает побочных эффектов, имеет минимум противопоказаний и хорошо совместим с другими лекарствами
- Эффективность подтверждена ведущими клиницистами



ферон

ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Адрес: 125424 г. Москва, Волоколамское ш., Д. 73
Производство: 123098 г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18, корп. А
ООО «ФЕРОН»
тел/факс (495/499) 193-3060, 646-1219 многоканальный
электронная почта: viferon@rol.ru
адрес web-сайта: <http://www.viferon.ru>
информационный сайт: <http://www.interferon.ru>