

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 62



5-6'2017

Научно-практический журнал

ФОРЦИС

НАТУРАЛЬНЫЙ ПРОДУКТ
С УНИКАЛЬНЫМ СОСТАВОМ

www.forcys.ru



ПОСТОРОННИМ ВХОД
ВОСПРЕЩЕН
БЛАГОДАРЯ ФОРЦИС!



Натуральный продукт



Уникальный состав
на российском рынке



Современная оригинальная
форма выпуска

Реклама. Свидетельство о государственной регистрации № RU 77.99.11.003.Е.008780.09.15 от 03.09.2015
ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ НЕОБХОДИМО ПРОКОНСУЛЬТИРОВАТЬСЯ С ВРАЧОМ.

БАД. НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»

Issued 12 times a year
Since 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: journalgnca@yandex.ru

Зав. редакцией Л. Б. Смирнова

Корректор: А. Н. Лобусева

Сайт: www.jantchem.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: gncajournal@yandex.ru

А. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2017

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 2017

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 62

5—6'2017

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

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

Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Проф., д. м. н. Белобородов В. А.

Проф. Говорун В. М.

Проф. Гомберг М. А.

Д. б. н. Даниленко В. Н.

Проф. Клишко Н. Н.

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

Проф., д. м. н. Никитин А. В.

Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.

Проф. Руднов В. А.

Проф. Тишков В. Н.

Проф., д. б. н. Фирсов А. А.

Проф., д. м. н. Яковлев С. В.

Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.

к.б.н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.

Бибикова М. В.

Васильев А. Н.

Волжанин В. М.

Дмитриева Н. В.

Долгова Г. В.

Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.

Ильина Е. Н.

Клясова Г. А.

Ленёва И. А.

Митрохин С. Д.

Романцов М. Г.

Сычев Д. А.

Тец В. В.

Цыбанев А. А.

Ших Е. В.

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

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

Оригинальные статьи

Лакатош С. А., Тренин А. С., Симонов А. Ю.,
Лавренов С. Н., Бычкова О. П., Цвигун Е. А.
Новые биологически активные соединения
в ряду производных 3-(индол-1-ил)-,
3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида

Лаврентьева И. Н., Сухобаевская Л. П., Зарубаев В. В.
Противовирусная активность экстракта
ладанника шалфеистого (*Cistus salviifolius*)
в отношении вируса гриппа

Суслов А. В., Семёнова Е. Ф.,
Митрошин А. Н., Моисеева И. Я.
Влияние цефтриаксона на состав пристеночной
и полостной микрофлоры тонкого кишечника
крыс линии Вистар

В помощь практикующему врачу

Коробова А. Г., Хрульнова С. А.,
Охмат В. А., Клясова Г. А.
Молекулярно-генетическое типирование
энтеробактерий с продукцией БЛРС,
выделенных от больных гемобластомами

Рамазанова Б. А., Ералиева Л. Т.,
Мустафина К. К., Колоскова Е. А.
Мультицентровое исследование распространённости
назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae*
на отдельных территориях Республики Казахстан
до и после начала противопневмококковой вакцинации

Мазина Н. К., Мазин П. В.,
Ипполитова А. А., Коваленко А. Л.
Оценка клинической эффективности циклоферона
при гепатите В и С у детей и взрослых по результатам
систематического обзора и метаанализа

Соловьева А. П., Горячев Д. В.,
Архипов В. В., Бунятян Н. Д.
Базисные подходы к оценке эффективности лечения
синдрома спастичности у детей с детским церебральным
параличом препаратами ботулинического токсина типа А

Стандартизация и контроль лекарственных средств

Саканян Е. И., Шемерянкина Т. Б.,
Бармин А. В., Зайцев С. А., Ярушок Т. А.
Фармацевтические субстанции.
Требования Государственной фармакопеи
к их стандартизации

Обзоры

Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н.
Вторичные метаболиты морских микроорганизмов.
III. Морские грибы — источник биологически
активных продуктов

По страницам журналов

Original Papers

3 Lakatos S. A., Trenin A. S., Simonov A. Yu.,
Lavrenov S. N., Bychkova O. P., Tsvigun E. A.
New Biologically Active Compounds in the Series
of 3-(indol-1-yl)-, 3-(N-aminoaryl)-,
and 3-(S-thioaryl)Maleimide Derivatives

12 Lavrentieva I. N., Sukhobaevskaya L. P., Zarubayev V. V.
The Antiviral Activity of the Sage-Leaved
Rockrose Extract (*Cistus Salviifolius*) Against
the Influenza Virus

21 Suslov A. V., Semyonova E. F.,
Mitroshin A. N., Moiseyeva I. Ya.
The Effect of Ceftriaxone on the Composition
of the Parietal and Cavitary Microflora
of the Small Intestine of Wistar Rats

Guidelines for Practitioners

26 Korobova A. G., Khrulnova S. A.,
Okhmat V. A., Klyasova G. A.
Molecular Genetic Typing of Enterobacteriaceae
Producing an Extended Spectrum Beta-Lactamase
in Patients with Hemoblastoses

35 Ramazanova B. A., Eralieva L. T.,
Mustafina K. K., Koloskova E. A.
A Multicenter Study of the Prevalence
of Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae*
in Selected Areas of the Republic of Kazakhstan Before
and After the Onset of Antipneumococcal Vaccination

43 Mazina N. K., Mazin P. V.,
Ippolitova A. A., Kovalenko A. L.
Cycloferon Efficiency in Children's and Adults' Hepatitis B
and C Treatment: Systematic Review
and Meta-Analysis Results

54 Solovyova A. P., Goryachev D. V.,
Arkhipov V. V., Bunyatyan N. D.
The Basic Approach to the Evaluation of the Effectiveness
of Treatment of Spasticity Syndrome in Children
with Cerebral Palsy with Type A Botulinum Toxin Drugs

Drug Standardization and Control

63 Sakanyan E. I., Shemeryankina T. B.,
Barmin A. V., Zaitsev S. A., Yarushok T. A.
Pharmaceutical Substances.
Requirements of the State Pharmacopoeia
for Their Standardization.

Reviews

68 Orlova T. I., Bulgakova V. G., Polin A. N.
Secondary Metabolites of Marine Microorganisms.
III. Marine Fungi — a Source of Bioactive Products

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.

Новые биологически активные соединения в ряду производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида

С. А. ЛАКАТОШ*, А. С. ТРЕНИН, А. Ю. СИМОНОВ, С. Н. ЛАВРЕНОВ, О. П. БЫЧКОВА, Е. А. ЦВИГУН

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

New Biologically Active Compounds in the Series of 3-(indol-1-yl)-, 3-(N-aminoaryl)-, and 3-(S-thioaryl)Maleimide Derivatives

S. A. LAKATOSH, A. S. TRENIN, A. YU. SIMONOV, S. N. LAVRENOV, O. P. BYCHKOVA, E. A. TSVIGUN

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Путём полного химического синтеза получены новые соединения в ряду 3,4-дизамещённых производных малеимида, обладающие выраженной антимикробной активностью *in vitro* в отношении грамположительных бактерий, дрожжей *Candida albicans* и грибов *Aspergillus niger*. Одновременно все изученные соединения оказались неактивными в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, что свидетельствует о специфическом характере их антимикробного действия. Ряд производных проявили себя в тест-системе с бактериальной культурой *Halobacterium salinarum*, используемой для отбора биологически активных соединений — ингибиторов биосинтеза стеролов и противоопухолевых антибиотиков, что позволяет предполагать наличие у них потенциальных противоопухолевых свойств. Наибольшую биологическую активность проявили 3-бromo-4-тиоарильные и 3,4-бистииоарильные производные, относящиеся к новому типу химических соединений, перспективных для дальнейшего изучения и создания на их основе новых антимикробных и противоопухолевых лекарственных средств.

Ключевые слова: малеимиды, индолилмалеимиды, тииоарилмалеимиды, производные трисалкилиндолилметана, антимикробные соединения, противоопухолевые соединения, антибактериальная и антифунгальная активность *in vitro*, микробная модель *Halobacterium salinarum* в поиске антибиотиков.

Novel compounds among 3,4-disubstituted maleimide derivatives that reveal a pronounced antimicrobial activity *in vitro* against Gram-positive bacteria, yeast *Candida albicans*, and fungi *Aspergillus niger* were obtained through total chemical synthesis. All these derivatives were simultaneously inactive against Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, indicating the specific nature of their antimicrobial action. A number of derivatives appeared to be active in *Halobacterium salinarum* test system, which is used for selecting biologically active compounds among sterol biosynthesis inhibitors and antitumor antibiotics. This data suggests that such derivatives seem to have potential antitumor properties. The most active compounds were 3-bromo-4-thioaryl and 3,4-bisthioaryl maleimides, which are related to a new type of chemical compounds, that are promising for further elaboration and development of new antimicrobial and antitumor drugs on their basis.

Keywords: maleimides, indolylmaleimides, thioarylmaleimides, trisalkylindolylmethan derivatives, antimicrobial and antitumor compounds, antibacterial and antifungal activity *in vitro*, *Halobacterium salinarum* microbial model in screening of antibiotics.

Введение

Основными направлениями в разработке новых антибиотиков являются: поиск биологически активных соединений среди продуктов микробного вторичного метаболизма, нередко сопровождаемый химической или биологической трансформацией выделенных соединений с целью улучшения их биологических свойств, и создание новых антибиотиков путём полного химического синтеза [1, 2]. В последнем случае наиболее пристального внимания заслуживают соединения, относящиеся к ранее не изученным классам химических веществ, а также производ-

ные, получаемые в ряду уже проявивших себя классов химических соединений.

Одним из классов веществ, перспективных для поиска новых биологически активных соединений, являются производные индолилмалеимида и их аналоги, многие из которых обладают противовирусным [3, 4], противоопухолевым [3, 5], а также, в ряде случаев, антибактериальным действием [3, 5, 6]. Например, противоопухолевые антибиотики: ребеккамицин — ингибитор топоизомеразы I [5, 7], стауроспорин, являющийся мощным, но неселективным ингибитором протеинкиназ [8, 9], или, например, такие синтетические аналоги природных соединений индол-3-ил малеимида, как BIS-VIII, являющийся мощным селективным ингибитором протеинкиназы C альфа [10] (рис. 1).

Наиболее изученным видом активности этой группы соединений является ингибиторная ак-

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБНУ «НИИНА»; E-mail: lakatosh@inbox.ru

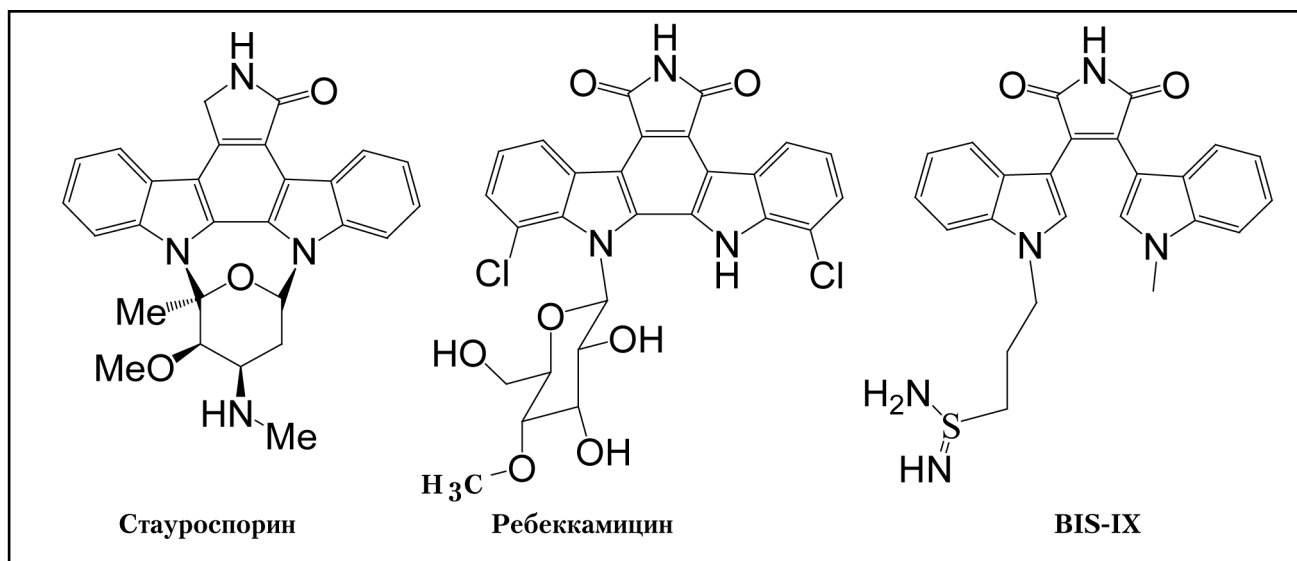


Рис. 1. Химическая структура стауроспорина, ребеккамицина и BIS-IX.

тивность в отношении ферментов протеинкиназ и связанные с этим биологические эффекты, главным образом, способность к подавлению опухолей.

Протеинкиназы, модифицирующие, как известно, другие белки путём фосфорилирования содержащихся в них аминокислот, либо по их гидроксильным группам, как у серина, треонина и тирозина, либо по остаткам гистидина, что встречается, в основном, у бактерий, играют важную роль в биологии клетки. Они участвуют в хемотаксисе, осморегуляции бактерий и грибов, в функционировании различных регуляторных систем растений [3, 11, 12]. При этом протеинкиназы, фосфорилирующие спиртовые остатки серина, треонина и тирозина, кардинальным образом отличаются по своей структуре и свойствам от протеинкиназ, проводящих фосфорилирование по гистидину, а протеинкиназы бактерий отличаются от протеинкиназ человека [3, 11, 12].

В настоящем исследовании были изучены производные 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида, полученные в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе путём полного химического синтеза. Ряд указанных соединений были синтезированы ранее и продемонстрировали свою способность к подавлению активности протеинкиназ. При этом, одни из них обладали активностью в отношении протеинкиназ человека, а другие — в отношении протеинкиназ бактерий [13, 14]. Вместе с тем, изучения антимикробного действия этих соединений до сих пор не проводилось.

Группа соединений, относящихся к тиаарильным производным малеимида, синтезированы впервые. Химические свойства и биологическая активность указанных соединений ранее не изучались.

Все малеимиды, приведённые в настоящем исследовании, обладали существенными отличиями по своей химической структуре от малеимидов — ингибиторов протеинкиназ, описанных ранее другими авторами, что позволяло надеяться на наличие у них серьёзных отличий в механизме действия и биологической активности от ранее изученных соединений.

Малеимиды, взятые для настоящего исследования, в свою очередь, отличались заметным структурным разнообразием, что повышало вероятность обнаружения биологически активных соединений, способствовало выявлению, так называемых, «соединений — хитов», обладающих повышенной биологической активностью, и при выявлении закономерности «структура — активность» позволяло наметить пути дальнейшей химической модификации с целью создания новых ценных биологически активных препаратов.

Материал и методы

Получение и очистка производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида, характеристика соединений. Методы получения новых соединений (4, 5, 11—13, 15) (рис. 2) и их физико-химические характеристики представлены ниже. Описание ранее синтезированных соединений и методы их получения подробно приведены в наших ранних публикациях: соединения 1 [10], 2, 3 [14], 6—8 [13], 9, 10 [15], 14 [16], 16 [17], 17—19 [18].

Биологическому тестированию подвергали растворы препаратов производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Получение и характеристика новых оригинальных соединений 4, 5, 11—13, 15. Получение 3-(4-(диметиламино)фениламино)-4-(3-(пирролидин-1-илметил)-1H-индол-1-ил)-1H-пиррол-2,5-диона (4). К раствору индолилмалеимида 20 (100 мг, 30 мМ) в уксусной кислоте (5 мл) добавили 100 мг параформальдегида и 50 мкл пирролидина, реакционную смесь оставили при перемешивании на 8 ч при 75°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь вылили в смесь

воды (30 мл) и этилацетата (30 мл) и нейтрализовали при перемешивании бикарбонатом натрия до прекращения выделения углекислого газа. Органический слой отделили, промыли насыщенным раствором NaCl, высушили (Na_2SO_4) и упарили в вакууме. Остаток кристаллизовали из изопропанола (5 мл). Получили 4 в виде кристаллов тёмно-коричневого цвета 85 мг, (21 мМ, 70%). Т. пл. 145–147°C (с разложением), ВЭЖХ анализ $R_t=17,37$ мин, 95,1%.

Точная масса ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2$ 430,2238, найдено 430,2250;

Спектр ^1H ЯМР, λ , м.д. (J, Гц): 1,65 (4H, шир с, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,36 (4H, шир с, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,63 (6H, с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3,62 (2H, s, CH_2N), 6,02 (2H, д, J = 9,0), 6,55 (2H, д, J = 9,0), 6,81 (1H, с), 6,96 (1H, т, J = 7,7), 7,03 (1H, т, J = 7,4), 7,10 (1H, д, J = 7,9), 7,53 (1H, д, J = 7,8), 9,52 (1H, шир с), 11,56 (1H, шир с);

Спектр ^{13}C ЯМР, λ , м.д.: 23,1 (2C, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 40,0 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 49,8 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}$), 53,2 (2C, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 92,6 (ч), 110,8, 111,3 (2C), 113,1 (ч), 118,8, 119,3, 121,6, 121,9 (2C), 126,4 (ч), 127,5 (ч) 128,1, 136,1 (ч), 137,4 (ч) 147,3 (ч), 167,5 (ч, C=O), 169,9 (ч, C=O); здесь и ниже, буква «ч» в скобках означает, что сигнал принадлежит четвертичному атому углерода.

3-(3-(Диметиламино)метил)-1H-индол-1-ил)-4-(4-морфолинофениламино)-1H-пиррол-2,5-дион (5) получали по методу, аналогичному описанному выше для соединения 4, из производного индолмалеимида 21 и водного раствора диметиламина с выходом 68% в виде кристаллов тёмно-коричневого цвета. Т. пл. 153–155°C (с разложением), ВЭЖХ анализ $R_t=15,16$ мин, 95,4%.

Точная масса ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3$ + H^+ 446,2187, найдено 446,2199.

Спектр ^1H ЯМР, λ , м.д. (J, Гц): 2,06 (1H, s), 2,77 (4H, т, J = 4,7, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,41 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{N}-$), 3,60 (4H, т, J = 4,7, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 6,25 (2H, д, J = 9,0), 6,57 (2H, д, J = 9,0), 6,83 (1H, s), 6,95 (1H, т, J = 7,8), 6,83 (1H, s), 7,02 (1H, т, J = 7,9), 7,08 (1H, д, J = 8,1), 7,50 (1H, д, J = 7,7), 9,59 (1H, br s), 11,61 (1H, br s).

Спектр ^{13}C ЯМР, λ , м.д.: 44,7 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 48,5 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 54,0 (1C, CH_2N), 65,9 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 99,4 (q), 101,5, 110,8, 113,0 (q), 114,2 (2C), 119,0, 1192, 121,7 (2C), 127,6 (q), 128,2, 129,1 (q), 135,8 (q), 137,4 (q), 147,6 (q), 167,5 (q, C=O), 169,8 (q, C=O).

Получение 3-Бromo-4-(3,4-диметоксифенилтио)-1H-пиррол-2,5-диона (11). К раствору дибромомалеимида 23 (100 мг, 40 мМ) в тетрагидрофуране (20 мл) при перемешивании добавляли в течение 3 ч раствор 3,4-диметокситиофенола (68 мг, 40 мМ) и триэтиламина (40 мг, 40 мМ) в тетрагидрофуране (50 мл). Реакционную смесь сконцентрировали в вакууме и растворили в смеси этилацетата (50 мл) и воды (50 мл), органический слой отделили и промыли 5% раствором NaHCO_3 (2×20 мл), высушили (Na_2SO_4) и упарили, остаток суспендировали в диэтиловом эфире (5 мл) осадок отфильтровали, промыли диэтиловым эфиром (1 мл). Получили 3-бromo-4-(3,4-диметоксифенилтио)-1H-пиррол-2,5-дион 11 в виде кристаллов желтого цвета. Т. пл. 103–105°C, ВЭЖХ анализ $R_t=7,24$ мин, 95,4%.

Точная масса, ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNO}_4\text{S}$ + H^+ 343,9587, найдено 343,9584.

Спектр ^1H ЯМР, λ , м.д. (J, Гц): 3,76 (3H, s), 3,79 (3H, s), 7,00 (1H, д, J = 9), 7,15 (1H, д, J = 8,5), 7,16 (1H, s), 11,48 (1H, s, NH)

Спектр ^{13}C ЯМР, λ , м.д.: 56,1, 56,9, 112,0, 116,5, 117,8, 119,1, 127,8, 141,5, 148,0, 151,0, 164,0, 165,7

3-бromo-4-(3,4-диметоксифенилтио)-1-метил-1H-пиррол-2,5-дион (12) был получен из 1-метил-3,4-дибромомалеимида 24 и 3,4-диметокситиофенола по методике, описанной выше для 3-бromo-4-(3,4-диметоксифенилтио)-1H-пиррол-2,5-диона (11) как кристаллический порошок желтого цвета с выходом 75%. Т. пл. 103–105°C, ВЭЖХ анализ $R_t=5,33$ мин, 95,7%.

Точная масса ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{BrNO}_4\text{S}$ + H^+ 357,9743 найдено 357,9753.

Спектр ^1H ЯМР, λ , м.д. (J, Гц): 2,91 (3H, с), 3,76 (3H, с), 3,80 (3H, с), 7,00 (1H, д, J = 9,0), 7,14 (1H, д, J = 8,6), 7,15 (1H, с).

Спектр ^{13}C ЯМР, λ , м.д.: 24,6, 55, 55,7, 111,9, 116,1, 117,5, 118,9, 127,4, 141,1, 148,8, 150,3, 164,8, 166,1

Получение 3,4-Бис(фенилтио)-1H-пиррол-2,5-диона (13). К раствору дибромомалеимида 23 (100 мг, 40 мМ) в тетрагидрофуране (20 мл) при перемешивании добавляли в течение 1 ч раствор тиофенола (90 мг, 80 мМ) и триэтиламина (80 мг, 80 мМ) в тетрагидрофуране (50 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 мин, сконцентрировали в вакууме и растворили в смеси этилацетата (50 мл) и воды (50 мл), органический слой отделили и промыли 5% раствором NaHCO_3 (2×20 мл), высушили (Na_2SO_4) и упарили, остаток суспендировали в диэтиловом эфире (5 мл), осадок отфильтровали, промыли диэтиловым эфиром (1 мл). Получили 3,4-бис(фенилтио)-1H-пиррол-2,5-дион 13 в виде порошка желтого цвета, 112 мг (35 мМ, 87%). Т.пл. 120–122°C (диэтиловый эфир). ВЭЖХ анализ $R_t=6,45$ мин, 96,3%.

Точная масса ESI-HRMS рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}_2$ + H^+ 314,0304 найдено 314,0314;

Спектр ^1H ЯМР, λ , м.д. (J, Гц): 7,22–7,33 (10H, m), 11,37 (1H, s).

Спектр ^{13}C ЯМР, λ , м.д.: 127,9 (2C), 129,0 (4C), 129,4, 130,7 (4C), 136,3 (2C), 167,5 (2C).

Получение 3-(9H-карбазол-3-иламино)-4-бromo-1H-пиррол-2,5-диона (15). К раствору 100 мг дибромомалеимида 23 (40 мМ) в 5 мл ДМФА добавляли триэтиламин (45 мг, 45 мМ) и 3-аминокарбазол (82 мг, 45 мМ). Реакционную смесь перемешивали при нагревании (70°C) в течение 8 ч. Выливали в смесь этилацетата (50 мл) и 1N HCl (20 мл), органический слой отделили и промывали 1N HCl (2×20 мл), насыщенным раствором NaHCO_3 (20 мл), сушили (Na_2SO_4) и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из изопропанола. Получали 3-(9H-карбазол-3-иламино)-4-бromo-1H-пиррол-2,5-дион 15 в виде кристаллов коричневого цвета Т. пл. 187–190°C, ВЭЖХ анализ $R_t=8,44$ мин, 97,2%.

Точная масса ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}$ + H^+ 356,0029, найдено 356,0038.

Спектр ^1H ЯМР, λ , м.д. (J, Гц): 7,16 (1H, т, J = 7,5 Hz), 7,28 (1H, dd, J = 9,1 Hz, J = 2,2 Hz), 7,39 (1H, т, J = 7,5 Hz), 7,93 (1H, s), 8,08 (1H, д, J = 8,0), 9,70 (1H, s), 10,91 (1H, s), 11,32 (1H, s);

Спектр ^{13}C ЯМР, λ , м.д.: 77,7, 110,3, 111,1, 117,3, 118,6, 120,4, 121,8, 122,3, 123,9, 125,8, 127,8, 137,9, 140,4, 142,5, 167,2, 168,8

Анализ физико-химических характеристик соединений. Спектры ЯМР регистрировали на приборе «Varian VXR-400» при частоте 400 МГц (ЯМР ^1H) и при 100 МГц (ЯМР ^{13}C), используя сигнал растворителя в качестве стандарта. Масс-спектры высокого разрешения ESI регистрировали на приборе «micrOTOF-Q II» («Bruker Daltonics GmbH», Германия). Растворы образцов (0,1 мг×мл⁻¹ в MeOH или MeCN) прямо вводили в ESI#источник с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 3 мкл×мин⁻¹. Положительно и отрицательно заряженные ионы анализировали при следующих условиях: напряжение на капилляре -4,5 и +4 кВ соответственно, давление азота в небулайзере (распылителе) 0,4 Бар (5,8 psi), скорость потока осушающего газа 4,0 л×мин⁻¹ и температура источника 180°C. Аналитическое ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа «Shimadzu LC10» на колонке Gemini 110A-C18 размером 4,6×250 мм с зернением 5 мкм («Phenomenex», США). Детектирование проводили на спектрофотометре «Shimadzu UV#VIS 10A» при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения. Подвижная фаза состояла из 0,2% HCOONH_4 (A) и ацетонитрила (B). Элюция проходила в градиентном режиме, при котором процентное содержание ацетонитрила (B) изменялось от 30 до 90% за 20 мин и сохранялось равным 90% — 10 мин при скорости потока — 1 мл×мин⁻¹. Объем пети инжектора — 10 мкл, образцы вводили до концентрации 0,01–0,05 мг×мл⁻¹ в смеси ацетонитрил–вода (1:1).

Препараты сравнения, материалы и реактивы. Препаратами сравнения служили левофлоксацин, «Белмедпрепараты РУП», Беларусь (в отношении бактерий) и амфотерицин В, Sigma, США (в отношении грибов), а также препарат трис(1-пентилалкилиндол-3-ил)метилия хлорида, полученный в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, как описано ранее [19, 20]. В модельной системе *Halobacterium salinarum* препаратом сравнения служил ловастатин (Merck Sharp & Dohme, США). Применяемый в этой системе препарат лактона D,L-меваилоновой кислоты (Sigma, США) для получения кислотной формы подвергали щелочной обработке, как описано ранее [21].

В работе использовали одноразовые стерильные 96-луночные планшеты, Пан-Эко, Россия, пластиковые чашки Петри, пластиковые стерильные пипетки, пробирки, Пан-Эко, Россия, одноканальные и многоканальные дозаторы ВНИИ БП, Россия, фильтры Sterivex-GV 0,22 мкм Millipore, США.

Микробные штаммы, питательные среды, условия культивирования. Для определения антимикробной активности препаратов были использованы следующие культуры бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 21027 (=209 P), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Halobacterium salinarum* (*H. halobium* ATCC 29341), дрожжи *Candida albicans* ATCC 14053 и грибная культура *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Для выращивания микроорганизмов и постановки экспериментов по выявлению биологической активности соединений использовали следующие жидкие и плотные питательные среды: триптиказо-соевый агар, среда Мюллера—Хинтон (Acumedia, Baltimore, США), среда Гаузе 2 следующего состава (г/л): глюкоза — 10, пептон — 5,0, триптон — 5,0, NaCl — 5,0, CaCO₃ — 2,5, агар — 20, pH 7,0—7,2. Дрожжи *C. albicans* выращивали на агаре Сабуро (пептон — 10 г, глюкоза — 40 г, агар — 20 г, дистиллированная вода — 1 л, pH 6,0), культуру мицелиальных грибов *Aspergillus niger* — на картофельно-глюкозном агаре (картофель — 200 г, глюкоза — 20 г, агар — 15 г, дистиллированная вода — 1 л, pH 5,5—6,0). Культуру *H. salinarum* выращивали в питательной среде с повышенным содержанием NaCl следующего состава (в %): NaCl — 18,0; MgSO₄·7H₂O — 0,1; K₂HPO₄ — 0,1; дрожжевой экстракт — 1,0; вода — до 100; pH — 7,0—7,2.

Для определения антибактериального действия использовали жидкую среду Мюллер—Хинтон, для выяснения действия соединений на грибы использовали среду RPMI 1640 с L-глутамином, без бикарбоната натрия, которую готовили из сухой среды (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) путём разведения в дистиллированной воде, последующего забуферивания с использованием 0,165 М морфолинпропансульфоновой кислоты (MOPS; ACROS ORGANICS, New Jersey, США) и доведения pH среды до 7,0 добавлением 1 н раствора NaOH. Питательную среду RPMI 1640 стерилизовали фильтрацией под давлением через фильтры Sterivex-GV 0,22 мкм (Millipore, США).

Определение антимикробной активности тестируемых соединений in vitro. Определение антимикробной активности тестируемых соединений *in vitro* производили путём выявления их минимальной подавляющей концентрации — методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде с использованием 96-луночных стерильных планшетов, в соответствии с требованиями Американского национального комитета клинических лабораторных стандартов [22—25], а также методом диффузии в агар.

Для экспериментов по определению антимикробной активности тестируемых соединений готовили инокулом бактериальных и грибных тест-культур, для чего использовали чистую суточную культуру бактерий, 2-суточную культуру дрожжей *C. albicans* и 5-суточную культуру грибов *A. niger*, выращенных на соответствующих плотных питательных средах при температуре 35°C. Далее в стерильном физиологическом растворе (0,85 % NaCl) готовили взвесь микроорганизмов, доводя её до определённой плотности. Плотность бактериальных суспензий составляла 0,5 по стандарту МакФарланда (1,5×10⁸ КОЕ/мл) и при дальнейшем разведении бульоном

Мюллера—Хинтон в 100 раз концентрация микробных клеток снижалась 5×10⁵ КОЕ/мл.

Плотность суспензии дрожжей и грибов контролировали спектрофотометрически, добываясь D=0,11 при длине волны 530 нм. Дальнейшее разведение средой RPMI 1640 суспензии дрожжевых клеток в 1000 раз и суспензии клеток грибов в 100 раз позволяло получить инокулом с двукратной, по сравнению с опытом, концентрацией клеток. Конечная концентрация дрожжевых клеток в опыте составляла 1—5×10³ клеток/мл. Конечная концентрация спор грибов в опыте составляла 0,4—5×10⁴ клеток/мл. Количество клеток в инокуляте проверяли путём посева на плотные питательные среды и подсчёта выросших колоний.

Тестируемые вещества растворяли в ДМСО с начальной концентрацией 5 мМ и в том же растворителе готовили серии двукратных разведений от 5 мМ до 36 мкМ. Затем полученные растворы в ДМСО разводили в 50 раз (сначала в 10, а потом в 5 раз) в стандартной используемой для опыта среде. При постановке опыта (т.е. при смешивании с инокулятом тест-микроорганизмов, приводившему к дальнейшему двукратному разведению) конечная концентрация растворителя снижалась до 1%.

Эксперименты проводили в стерильных 96-луночных плоскостонных планшетах. В лунки каждого планшета вносили сначала по 100 мкл растворов серийных разведений тестируемых препаратов (содержание ДМСО — 2%), а затем по 100 мкл раствора инокулята тест-культуры. Конечная концентрация препаратов в опыте после внесения микробных инокулятов составляла от 50 до 0,15 мМ при концентрации растворителя (ДМСО) 1%. Испытания проводили не менее чем в трёх повторностях. В панель эксперимента в качестве контроля включали лунки, не содержащие тестируемых препаратов или растворителя.

Планшеты инкубировали при 35°C. Оценку роста культур проводили визуально через 24 ч для бактериальных культур и культуры *C. albicans* и через 48 ч для *A. niger*. МПК определяли как минимальную концентрацию препарата, полностью предотвращающую рост тест-организма.

При изучении антимикробного действия соединений методом диффузии в агар в чашках Петри на поверхность органического агара Гаузе 2, с внесёнными в него тестируемыми соединениями в различной концентрации, наносили суспензии соответствующих тест-культур, после чего чашки помещали в термостат и выдерживали при 35°C до полного прорастания тест-культур. МПК определяли как минимальную концентрацию препарата, предотвращающую рост тест-культуры.

При использовании разновидности метода диффузии в агар в плотной питательной среде Гаузе 2 с внесённой суспензией микробной тест-культуры делали лунки диаметром 9 мм, после чего в них вносили тестируемые соединения в разной концентрации в виде 20% водных растворов ДМСО. Чашки инкубировали при 37°C 16 ч до полного прорастания тест-культур и появления отчётливых зон подавления роста вокруг лунок, что позволяло проводить количественное определение тестируемых соединений путём измерения диаметра зон.

Тест-система для выявления противоопухолевых соединений. Работу с бактериальной культурой *H. salinarum* проводили как описано ранее [21, 26]. Выращивание микробной культуры производили в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах с круглым дном, предназначенных для проведения иммунологических реакций («Медполимер», С-Пб.). Объём питательной среды в каждой лунке (пробе) составлял 150 мкл. Инкубирование проводили в термостате при 37°C в течение 5—22 сут. Для предотвращения высыхания проб в термостате создавали условия повышенной влажности.

В качестве посевного материала использовали культуру *H. salinarum*, выращенную на агаризованных питательных средах в течение 1 нед. Клетки суспендировали в жидкой питательной среде с использованием вибратора «Вортекс ELMi» (Латвия) и разводили питательной средой до нужного объёма. Начальная оптическая плотность посевного материала, кон-

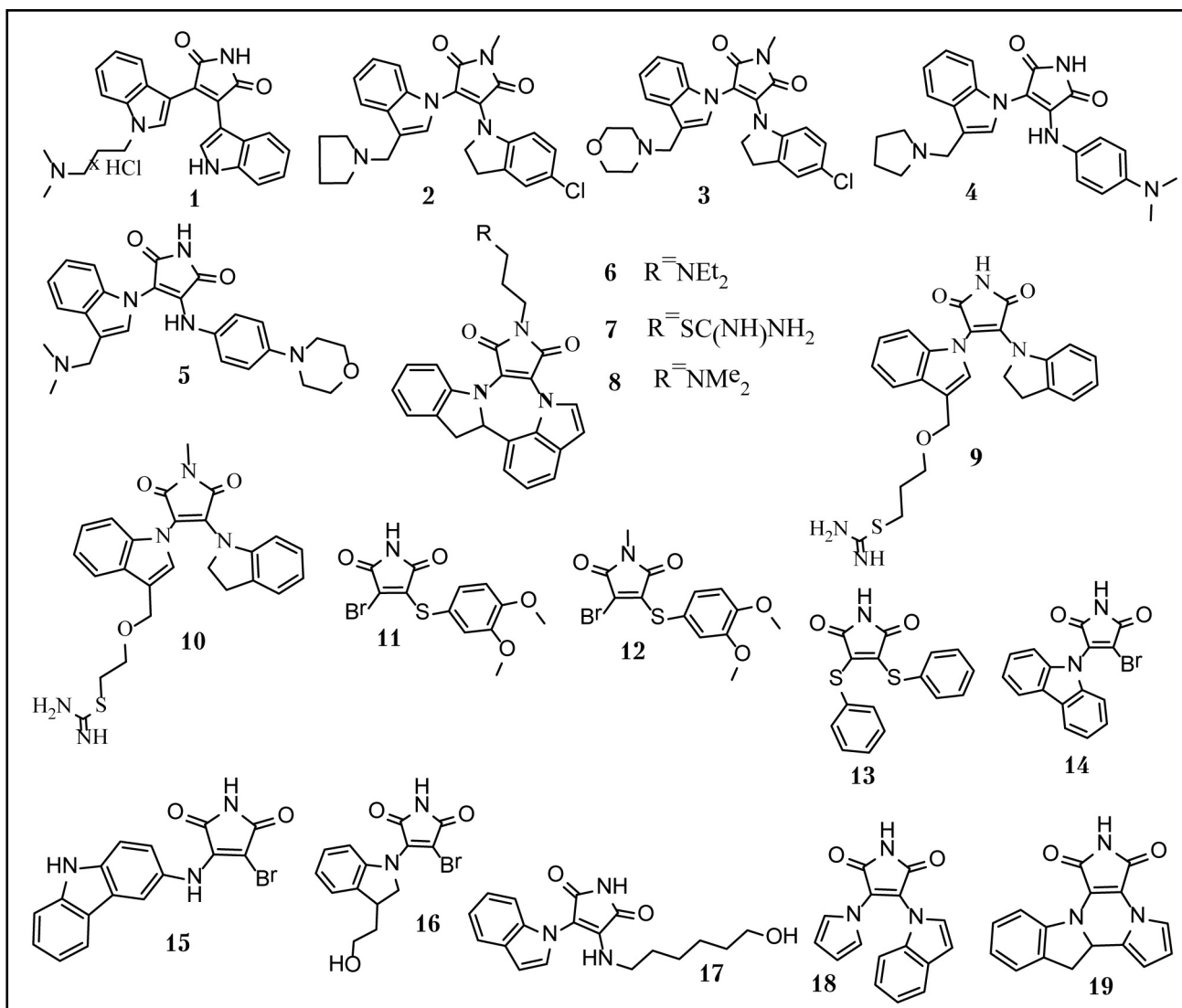


Рис. 2. Химическая структура изучаемых соединений.

тролируемая в микрокалориметре МКМФ-1 (Россия), составляла 0,005–0,015 (в 1 см кюветах при 570 нм).

Препарат мевалоновой кислоты вносили в конечной концентрации 3 мМ непосредственно в питательную среду в начале культивирования.

Исследуемые препараты растворяли в ДМСО с начальной концентрацией 6,4 мМ, в том же растворителе готовили серии двукратных разведений от 6400 до 12,5 мкМ и вносили в среду культивирования *H. salinarum*. При внесении в каждую ячейку препарата из расчёта 1,5 мкл на 150 мкл среды конечное содержание ДМСО в эксперименте не превышало 1%. Концентрацию препаратов рассчитывали в мкМ.

Каждый препарат в эксперименте присутствовал не менее, чем в трёх повторностях. В панель эксперимента в качестве контроля включали лунки, не содержащие тестируемых препаратов или растворителя.

Оценку роста проводили фотометрически с помощью микроплейтфотометра вертикального сканирования (ИФКО-2, Россия) после перемешивания содержимого лунок, а также визуально, оценивая рост клеток *H. salinarum* в виде плотного осадка красного цвета на дне лунки [21].

МПК определяли как минимальную концентрацию препарата, полностью предотвращающую рост тест-организма (МПК-1, шкала роста = 0). Для выявления тонких различий

между препаратами в ряде случаев МПК оценивали как минимальную концентрацию, при которой допускался умеренный (50% от уровня контроля) рост тест-организма (МПК-2, шкала роста = 2) [27].

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием компьютерных программ Statgraf и Microsoft Excel, рассчитывая средние арифметические значения, доверительные интервалы и стандартное отклонение. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты исследования

Химическая структура всех малеимидов, представленных в настоящем исследовании, приведена на рис. 2.

Ряд соединений (номера: 1–3, 6–8, 9, 10, 14, 16, 17–19) были синтезированы нами ранее [13–18], другие соединения (номера: 4, 5, 11–13, 15) были впервые получены в настоящем исследовании.

Представлены схемы синтеза новых оригинальных соединений 4, 5, 11–13, 15. Производные 4 и 5 были получены из описанных ранее ин-

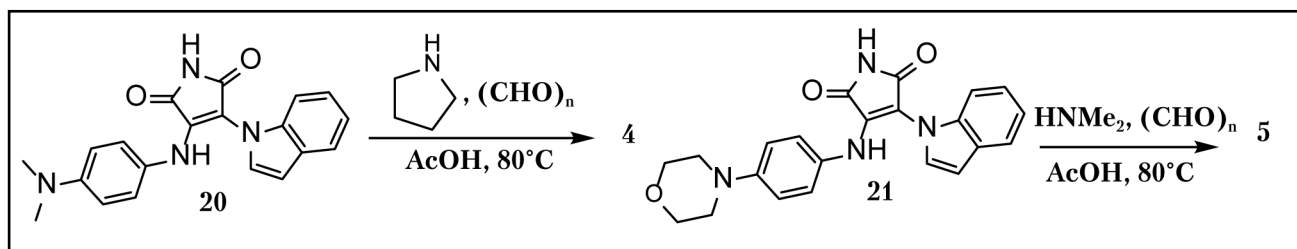


Рис. 3. Схема синтеза соединений 4 и 5.

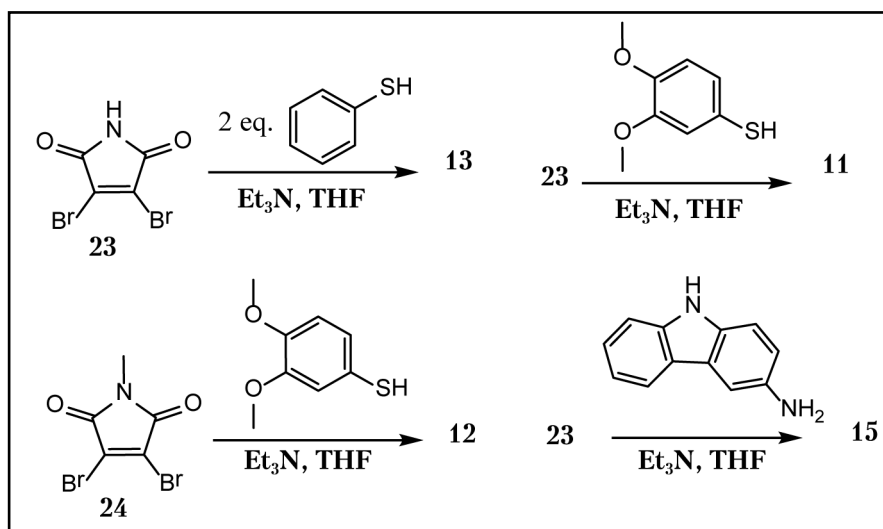


Рис. 4. Схема синтеза соединений 11-13, 15.

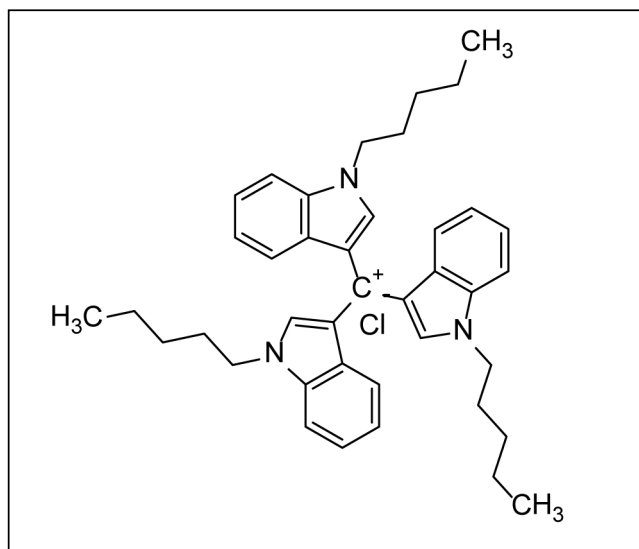


Рис. 5. Соединение 25. Производное турбомицина А-хлорид трис(1-пентилиндол-3-ил)метилия.

долилмалеимидов **20** и **21** [18] по реакции Манниха, в стандартных условиях (рис. 3).

Производные **11–13** и **15** были получены конденсацией дибромомалеимидов **23** и **24** с соответствующими тиофенолами или аминокарбазолом в присутствии основания (триэтиламин). В

зависимости от условий реакции оказалось возможным получение как ди-, так и моноариловых производных (**13** или **11**, **12**) (рис. 4).

Использованные в работе соединения относились к производным малеимида, замещённым по положениям **3** и **4**, однако принадлежали к различным классам химических соединений. Условно их можно разделить на несколько групп:

- 1) диалкиламинометильные производные 3-(индол-1-ил)-4-аминоарилмалеимидов (**2–5**),
- 2) производные по малеимидному атому азота малеимидодиазепина (**6–8**),
- 3) метиленоксиалкильные производные (**9**, **10**),
- 4) арилтиольные производные (**11–13**),
- 5) другие (стандартный ингибитор протеинкиназы С альфа (**1**); 4-замещённые 3-бромалеимиды (**14–16**); 3-индоло-4-пирроломалеимид **18** и его циклический аналог **19**).

Широкий диапазон взятых в испытание малеимидов объясняется необходимостью повысить вероятность обнаружения среди них соединений, обладающих биологической активностью. Кроме того, в связи с чрезвычайно большим разнообразием существующих у бактерий и животных протеинкиназ, на которые малеимиды способны оказывать свое ингибирующее воздействие, значительное разнообразие малеимидов по химической структуре может способствовать обнаружению соединений, обладающих специфичностью в отношении микробных клеток. Широта диапазона полезна также для общей оценки изучаемых групп малеимидов с целью выявления среди них наиболее перспективных классов соединений для проведения дальнейшей химической модификации.

При оценке антимикробного действия в качестве препаратов сравнения были использованы фторхинолоновый антибиотик третьего поколения левофлоксацин (в отношении бактерий), амфотерицин В (в отношении грибов). Активность производных ма-

Таблица 1. МПК производных малеимида, обладающих антимикробной активностью

Соединение	МПК, мкМ				
	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>S.aureus</i> ATCC 21027	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>C.albicans</i> ATCC 14053	<i>A.niger</i> ATCC 16404
11	1	1	80	40	12
12	4	2	>128	60	3
13	10	8	>128	20	10
14	12	8	>128	20	12
25	—	1	>128	2	2
Лф	4	1	0,5	>128	>128
Ам В	>128	>128	>128	0,5	0,5

Примечание. МПК — минимальная подавляющая концентрация; Лф — левофлоксацин (для бактерий); АмВ — амфотерицин В (для грибов).

леимида была сопоставлена с активностью нового соединения **25** — с новым антибиотиком — производным турбомицина А — пентильным производным трис(1-алкилиндол-3-ил)метана, разработанным в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе (рис. 5).

Ряд производных показали выраженную антимикробную активность *in vitro* в отношении грамположительных бактерий, дрожжей *C.albicans* и грибов *A.niger* (табл. 1). Наиболее активными в отношении грамположительных бактерий оказались вновь синтезированные арилтиольные производные — соединения **11** и **12**. Их МПК в отношении *S.aureus* ATCC 21027 составила, соответственно, 1 и 2 мкМ. Оба соединения были активны в отношении грибов *A.niger* и практически не активны в отношении дрожжей *C.albicans*. Особенно высокую активность в отношении грибов *A.niger* проявило соединение **12** (МПК 3 мкМ).

Тиоарильное производное **13** и 4-замещённый 3-броммалеимид **14** проявляли умеренную активность в отношении грамположительных бактерий *S.aureus* (МПК 8 мкМ) и грибов *A.niger* (МПК 10 и 12 мкМ). При этом оба соединения проявили активность в отношении дрожжей *C.albicans* (МПК 20 мкМ).

По своей активности в отношении грамположительных бактерий наиболее активные соединения **11** и **12** практически не уступали левофлоксацину, взятому в качестве препарата сравнения, а также новому высокоактивному бутильному производному трисинолилметана (**25**).

Вместе с тем все изученные соединения оказались практически полностью неактивными в отношении грамотрицательных бактерий *E.coli* что свидетельствует о специфическом характере их антимикробного действия.

Оценка соединений **1—19** и **25** в тест-системе *H.salinarum*, применяемой нами для отбора ингибиторов биосинтеза стеролов и противоопухолевых антибиотиков, показала, что многие производные малеимида проявляют себя в указанной тест-системе (табл. 2). Наиболее активные тиоарильные соединения **11—13** проявили умеренную активность в отношении *H.salinarum* (МПК 8—16

Таблица 2. МПК производных малеимида, обладающих антимикробной активностью

Соединение	МПК, мкМ	
	МПК-1 ¹	МПК-2 ²
1	32	16
2	24	8
3	24	8
4	16	4
5	>64	32
6	16	2
7	>64	64
8	24	3
9	32	8
10	>64	32
11	8	1
12	16	2
13	16	4
14	64	16
15	>64	16
16	>64	>64
17	>64	>64
18	64	16
19	>64	64
25	8	1
Ловастатин	3	0,7

Примечание. ¹ — МПК-1 — определена как минимальная концентрация препарата, полностью предотвращающая рост тест-культуры; ² — МПК-2 — определена как минимальная концентрация препарата, при которой происходит подавление роста на 50%.

мкМ), правда, существенно меньшую, чем взятый для сравнения ингибитор биосинтеза стеролов ловастатин (МПК 3 мкМ).

Внесение в тест-систему *H.salinarum* экзогенной мевалоновой кислоты, резко снижало подавляющее действие ловастатина, однако не влияло на активность производных малеимида, что свидетельствует о серьёзных отличиях в механизме действия указанных соединений от ловастатина. Вместе с тем, способность к подавлению *H.salinarum* соединениями **11—13**, препаратом **25**, а также такими соединениями, как **4**, **6** и **8**, которые не проявили никакой иной антимикробной активности, позволяет предполагать наличие у этих производных потенциальных противоопухолевых свойств.

Вместе с тем соединение **14**, которое проявило выраженную антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий, дрожжей и грибов (см. табл. 1), в тесте с *H.salinarum* было практически неактивным (см. табл. 2), что заставляет рассматривать его исключительно в качестве потенциального антимикробного препарата.

Обсуждение результатов

В настоящем исследовании проводилась оценка соединения в ряду производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида, полученных в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе путём полного химического синтеза. У ряда соединений выявлена антимикробная активность *in vitro* в отношении грамположительных бактерий и грибов. Некоторые соединения проявили активность в отношении бактериальной культуры *H.salinarum*, разработанной нами для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов и хорошо зарекомендовавшей себя в отборе соединений, обладающих противоопухолевым действием [21, 26].

Стандартный ингибитор протеинкиназы С альфа BIS-I (соединение **1**) не проявил активности в отношении культур бактерий, дрожжей и грибов в первом тесте и лишь незначительную активность в отношении культуры *H.salinarum*. Из группы диалкиламинометильных производных **2–5** ни одно не было активно в отношении культур бактерий, дрожжей и грибов. В тоже время, они обладали слабой и умеренной (в случае соединения **4**) активностью в отношении культуры *H.salinarum*.

Производные по малеимидному атому азота малеимидодиазепина **6–8** также не проявили антимикробной активности в отношении большинства тест-культур. Вместе с тем у диэтиламино- (**6**) и диметиламинопропильного (**8**) производных выявлена активность в отношении *H.salinarum*. В то же время соединение **7**, содержащее остаток тиомочевины, оказалось в этом тесте практически неактивным. Производные **9** и **10** были, практически, не активны во всех тестах.

Наибольшую активность как в отношении микробных тест-культур, так и в отношении *H.salinarum* проявили впервые синтезированные тиофенольные производные **11–13**. 3-Бromo-4-(3,4-диметокситиофенил)малеимид (**11**) и его метильное производное **12** проявили выраженную активность в отношении *B.subtilis* ATCC 6633, *S.aureus* ATCC 21027, а также активность в отношении *A.niger* ATCC 16404. Следует отметить, что замена малеимидного атома водорода на метил увеличила активность в отношении *A.niger* в четыре раза, при некотором снижении активности в отношении бактериальных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тренин А.С. Методология поиска новых антибиотиков: состояние и перспективы. Антибиотики и химиотерапия 2015; 60: 7–8: 34–46. /

В тесте с *H.salinarum* производное **11** проявило максимальную активность во всей протестированной серии, сравнимую с активностью препарата **25**. Введение метильного заместителя по малеимидному атому азота у соединения **11** привело к снижению активности вдвое. Бистиофенильное производное **13** проявило умеренную активность в отношении *B.subtilis* и *S.aureus*, а также в отношении *C.albicans*, *A.niger*. В тесте с *H.salinarum* соединение **13** проявило умеренную активность.

Карбазольное производное **14**, обладавшее спектром и уровнем антимикробной активности, как у производного **13**, в тесте с *H.salinarum*, в отличие от соединения **13**, оказалось малоактивным. Продукт конденсации 3,4-дибромомалеимида с 3-аминокарбазолом (соединение **15**) не проявил никакой биологической активности. Подобные результаты отмечены также для соединений **16–19**.

Таким образом, настоящее исследование показало, что производные малеимидов могут обладать выраженной антимикробной активностью как в отношении грамположительных бактерий, так и грибов. Тот факт, что все испытанные соединения в отношении грамотрицательных бактерий *E.coli* были неактивными, свидетельствует о специфическом характере их антимикробного действия.

Следует отметить, что антимикробная активность соединений в ряду производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида выявлена впервые. Дальнейшее изучение подобных соединений с целью получения более активных антибактериальных или антифунгальных средств является весьма перспективным направлением в создании новых лекарственных препаратов.

Заключение

Результаты исследования демонстрируют возможность создания в ряду производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида соединений, обладающих антимикробной, антифунгальной и, возможно, противоопухолевой активностью. Антибактериальная и антифунгальная активность у тиофенильных производных малеимида обнаружена впервые. Полученные сведения говорят о перспективности соединений подобного типа для разработки на их основе новых антибактериальных, антифунгальных и, возможно, противоопухолевых лекарственных средств.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10300)

Trenin A.S. Metodologija poiska novykh antibiotikov: sostoyanie i perspektivy. Antibiotiki i khimioter 2015; 60: 7–8: 34–46. [in Russian]

2. Drug discovery: practices, processes, and perspectives / Ed. by Jie Jack Li, E.J. Corey. ISBN 978-0-470-94235-2, John Wiley & Sons, Inc., 570 p.

3. Cohen P. Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 4: 309—315.
4. Shugar D. Viral and host-cell protein kinases: enticing antiviral targets and relevance of nucleoside, and viral thymidine, kinases. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 2—3: 315—335.
5. Pindur U., Kim Y.-S., Mehrabani F. Advances in indolo[2,3-a]carbazole chemistry: design and synthesis of protein kinase C and topoisomerase I inhibitors. *Curr Med Chem* 1999; 6: 1: 29—69.
6. Mahboobi S., Eichhorn E., Popp A. et al. 3-Bromo-4-(1H-3-indolyl)-2,5-dihydro-1H-2,5-pyrroledione derivatives as new lead compounds for antibacterially active substances. *Eur J Med Chem* 2006; 41: 2: 176—191.
7. Moreau P., Anizon F., Sancelme M. et al. Syntheses and biological evaluation of indolocarbazoles, analogues of rebeccamycin, modified at the imide heterocycle. *J Med Chem* 1998; 41: 10: 1631—1640.
8. Omura S., Iwai Y., Nakayawa A. et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 1977; 30: 4: 275—282.
9. Rüegg U.T., Burgess G.M. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends in Pharmacological Science* 1989; 10: 6: 218—220.
10. Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000; 351 (Pt 1): 95—105.
11. Danilenko V.N., Osolodkin D.I., Lakatosh S.A., Preobrazhenskaya M.N., Shtil' A.A. Bacterial Eukaryotic Type Serine-Threonine Protein Kinases: From Structural Biology to Targeted Anti-Infective Drug. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 1352—1369.
12. Santos J.L., Shiozaki K. Fungal Histidine Kinases. *Science's STKE* 2001; 2001: Issue 98: pp. re1.
13. Simonov A.Y., Lakatosh S.A., Printsevskaya S.S. et al. Search for Inhibitors of Bacterial and Human Protein Kinases among Derivatives of Diazepines[1,4] Annulated with Maleimide and Indole Cycles. *J Med Chem* 2008; 51: 24: 7731—7736.
14. Simonov A.Yu., Lakatosh S.A., Luzikov Yu.N. et al. Synthesis of 4-substituted 3-[3-(dialkylaminomethyl)indol-1-yl]maleimides and study of their ability to inhibit protein kinase Ca, prevent development of multiple drug resistance of tumor cells and cytotoxicity. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2008; 57: 9: 2011—2020.
15. Simonov A.Yu., Lakatosh S.A., Luzikov Yu.N., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N. Nucleophilic substitution and cyclization reactions involving quaternized 3dimethylaminomethyl derivatives of 3,4bis(indolyl)maleimide and 3-(indol-1-yl)-4-(indol-1-yl)maleimide. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2010; 59: 7: 1442—1450.
16. Lakatosh S.A., Luzikov Y.N., Preobrazhenskaya M.N. Synthesis of 6H-pyrrolo[3',4':2,3][1,4]diazepino[6,7,1-h]indole-8,10(7H,9H)-diones using 3-bromo-4-(indol-1-yl)maleimide scaffold. *Organ Biomolec Chem* 2003; 1: 826—833.
17. Simonov A.Y., Lakatosh S.A., Luzikov Yu.N. et al. Macrolactones built from the bis-3,4(indol-1-yl)maleimide scaffold *Tetrahedron* 2014; 70: 625—630.
18. Lakatosh S.A., Bykov E.E., Preobrazhenskaya M.N. Synthesis of 2-hetaryl-3-(indol-1-yl)-and -(3-pyrrol-1-yl)maleimides and study of their conversions under the action of protic acids. *Chem Heterocyclic Comp* 2011; 46: 1224—1232.
19. Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E. et al. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl)methyl salts: role of N-alkyl substituents. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 18: 6905—6913.
20. Степанова Е.В., Штиль А.А., Лавренов С.Н. и др. Соли трис(1-алкилиндо-3-ил)метилия — новый класс противоопухолевых соединений. *Известия Академии наук. Сер химическая*. 2010; 12: 1—9. / Stepanova E.V., Shtil' A.A., Lavrenov S.N. i dr. Soli tris(1-alkilindol-3-il)metilija — novyj klass protivopukhlevykh soedinenij. *Izvestija Akademii nauk. Ser khimicheskaja*. 2010; 12: 1—9. [in Russian]
21. Тренин А.С. Микробная модель *Halobacterium salinarum* для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 5—6: 3—10. / Trenin A.S. Mikrobnaja model' *Halobacterium salinarum* dlja poiska ingibitorov biosinteza sterolov. *Antibiotiki i khimioter* 2013; 58: 5—6: 3—10. [in Russian]
22. Рекомендации Национального Комитета Клинических Лабораторных Стандартов США (NCCLS), [NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antibacterial Susceptibility Testing, USA 2000]. / Rekomendacii Nacional'nogo Komiteta Klinicheskikh Laboratornykh Standartov SSHA (NCCLS), [NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antibacterial Susceptibility Testing, USA 2000]. [in Russian]
23. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012; 944. / Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Chast' 1. / Pod red. A.N. Mironova. M.: Grif i K, 2012; 944. [in Russian]
24. Clinical and laboratory standards institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. In *Third International Supplement CLSI M27-S3*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania. 2013.
25. Clinical and laboratory standards institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. In *approved standart*. 2nd ed CLSI M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania. 2008.
26. Тренин А.С., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Лавренов С.Н. Микробная модель *Halobacterium salinarum* в отборе синтетических аналогов антибиотика турбомуцина А, обладающих противоопухолевым действием. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 9—10: 3—7. / Trenin A.S., Cvigun E.A., Bychkova O.P., Lavrenov S.N. Mikrobnaja model' *Halobacterium salinarum* v otdore sinteticheskikh analogov antibiotika turbomicina A, obladajushhikh protivopukhlevym dejstviem. *Antibiotiki i khimioter* 2013; 58: 9—10: 3—7. [in Russian]
27. Wayne P.A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; *Approved Standard*. NCCLS Document M38-A. NCCLS. 2002. ISBN 1-56238-470-8.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лакатос Сергей Александрович — к. х. н., Старший научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Тренин Алексей Сергеевич — д. б. н., Заведующий лабораторией Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Симонов Александр Юрьевич — к. х. н., Научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Лавренов Сергей Николаевич — к. х. н., Старший научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Бычкова Ольга Петровна — к. б. н., Старший научный сотрудник лаборатории Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА», Москва

Цвигун Елена Анатольевна — научный сотрудник лаборатории Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА»

Противовирусная активность экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в отношении вируса гриппа

И. Н. ЛАВРЕНТЬЕВА, Л. П. СУХОБАЕВСКАЯ, В. В. ЗАРУБАЕВ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

The Antiviral Activity of the Sage-Leaved Rockrose Extract (*Cistus Salviifolius*) Against the Influenza Virus

I. N. LAVRENTIEVA, L. P. SUKHOBAEVSKAYA, V. V. ZARUBAYEV

Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg

Проведено исследование протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) и биологически активной добавки Форцис в культуре клеток MDCK и на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Изученный экстракт ингибировал репродукцию всех использованных вирусов гриппа. Наиболее чувствительными к нему оказались вирусы A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Для них значения IC_{50} составили 0,5; 0,5 и 0,4 мкг/мл, а индексы селективности — 382, 382 и 478, соответственно, что характерно для препаратов с высокой противовирусной активностью. Вирусы гриппа типа В были менее чувствительны к экстракту. Ингибирующая активность экстракта не зависела от чувствительности или устойчивости вирусов к используемым противогриппозным препаратам — осельтамивиру и ремантадину. При гриппозной пневмонии у животных снижение специфической смертности составило 40% по сравнению с группой плацебо. Применение биологически активной добавки Форцис не влияло на инфекционную активность вируса гриппа в ткани легких животных и приводило к умеренному ограничению степени поражения ткани лёгких. Максимальная эффективность биологически активной добавки «Форцис» достигалась при лечебно-профилактическом режиме её использования.

Ключевые слова: противовирусная активность, белые мыши, экстракт ладанника шалфеелистного, Форцис.

A study of the protective activity of the Sage-leaved Rockrose extract (*Cistus salviifolius*) and the biologically active additive Forcys in the MDCK cell culture and on the model of lethal influenza pneumonia in white mice was carried out. The studied extract inhibited the reproduction of all used influenza viruses. The most sensitive to it were the viruses A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), and A/Vladivostok/02/09 (H1N1). The IC_{50} values of the listed viruses were 0.5, 0.5, and 0.4 $\mu\text{g/ml}$, and the selectivity indexes were 382, 382, and 478, respectively, which is characteristic for preparations with high antiviral activity. Type B influenza viruses were less sensitive to the extract. The inhibitory activity of the extract did not depend on the susceptibility or resistance of the viruses to the anti-influenza drugs used, oseltamivir and rimantadine. The reduction in specific mortality with influenza pneumonia in animals was 40% compared with the placebo group. The use of the biologically active supplement Forcys did not affect the infectious activity of the influenza virus in the tissues of the animals lungs and led to a moderate limitation of the degree of damage to lung tissue. The maximum effectiveness of the biologically active supplement Forcys was achieved with the therapeutic and prophylactic regimens of its use.

Keywords: antiviral activity, white mice, Sage-leaved Rockrose extract, Forcys.

Введение

Грипп является наиболее распространённой и опасной респираторной вирусной инфекцией, способной вызывать ежегодные эпидемии и пандемии, приводящие к высокой заболеваемости и смертности населения [1]. Благодаря короткому жизненному циклу и высокой генетической изменчивости, он остаётся трудно контролируемой инфекцией, несмотря на успехи, достигнутые в области химиотерапии и вакцинопрофилактики.

Наиболее эффективным противогриппозным средством является специфическая вакцинация, однако вследствие антигенного дрейфа вируса необходим постоянный мониторинг и разработка новых вакцинных штаммов, соответствующих циркулирующим в человеческой популяции в каждый конкретный эпидемический сезон.

Наряду с вакцинацией для предотвращения и лечения заболевания применяется химиотерапия гриппа. С этой целью в настоящее время в клинике используются этиотропные препараты двух групп, отличающиеся по механизму действия и задействованным мишеням. Препараты первой группы — производные адамантана ремантадин и амантадин — блокируют активность вирусного

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 197101 Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

ионного канала M2, препятствуя процессу диссоциации вирусных РНП из состава вириона в лизосомальной вакуоли [2]. Препараты второй группы ингибируют вирусную нейраминидазу — фермент, обеспечивающий почкование вирусных частиц и их дальнейшее распространение. К этой группе соединений относятся занамивир (действующее начало препарата Реленца®), осельтамивир (Тамифлю®), перамивир (Рапиваб®) и ланинамивир (Инавир®) [3], последние два в России не зарегистрированы. Кроме того, в Японии, Китае и Корее для лечения гриппа применяется препарат Т-705 (Фавипиравир), являющийся нуклеозидным аналогом [4–6], направленный на вирусную полимеразу и обладающий, помимо вируса гриппа, активностью против широкого круга других вирусов [7].

Все перечисленные соединения имеют свои недостатки. Сюда относятся сравнительно высокая токсичность и узкий спектр действия производных адамантана, высокая стоимость ингибиторов нейраминидазы, а главное — быстрое формирование вирусной устойчивости к препаратам обеих групп. Так, с середины 1990 годов было отмечено резкое возрастание доли ремантадин-устойчивых штаммов, и в настоящее время все изоляты вируса гриппа А, за редким исключением, являются нечувствительными к препаратам адамантанового ряда [8]. Аналогичная ситуация наблюдалась в случае Тамифлю в пределах вируса гриппа подтипа H1N1 в 2007 г., когда в период с ноября 2007 по март 2009 гг. уровень осельтамивир-устойчивости вирусов достиг 100% во всех регионах земного шара [9, 10].

Учитывая перечисленные особенности химиотерапии гриппа, поиск и внедрение новых эффективных средств профилактики и борьбы с этой инфекцией, действующих на принципиально иные мишени и имеющих альтернативный механизм активности, является исключительно важным направлением медицинской науки и здравоохранения в целом. Целью настоящего исследования была оценка протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) в отношении вируса гриппа.

Материал и методы

Вирусы и клетки. В работе использовали следующие вирусы:

- A/California/07/09 (H1N1)pdm09;
- A/Aichi/2/68 (H3N2);
- A/Puerto Rico/8/34 (H1N1);
- A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
- A/Vladivostok/02/09 (H1N1);
- B/Lee/40;
- B/Malaysia/2506/04;
- B/Florida/04/06.

Вирусы пассировали в аллантоисной полости 10–12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч (вирусы гриппа А) или 72 ч (вирусы гриппа В) при 36°C. Титрование инфекционной активности вирусов проводили на клетках MDCK (ATCC

CCL-34), выращенных на 96-луночных панелях на среде MEM (Биолот, Санкт-Петербург).

Животные. Белых беспородных мышей (самки) массой 16–18 г (возраст 5–6 недель) получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных». National Academy press. — Washington, D.C. 1996, ГОСТ Р 53434-2009, а также с правилами, утверждёнными МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Исследуемые вещества. Для экспериментов *in vitro* использовали сухой экстракт ладанника шалфеелистного в виде сухого коричневого порошка. В качестве препарата сравнения использовали осельтамивира карбоксилат (LaRoche, Швейцария). Для опытов на животных использовали биологически активную добавку «Форцис» в виде таблеток по 500 мг, из которых экстракт ладанника составляет 90 мг. В качестве препарата сравнения использовали Тамифлю (осельтамивира фосфат, LaRoche, Швейцария) в виде капсул по 75 мг.

Изучение цитотоксичности образцов. Для определения цитотоксичности из экстракта ладанника и осельтамивира карбоксилата готовили серию трёхкратных разведений от 1000 до 4 мкг/мл и от 1 до 0,01 мкг/мл, соответственно, на среде MEM (Биолот, Санкт-Петербург). Клетки инкубировали в присутствии образцов в течение 48 ч при 36°C и 5% CO₂, после чего степень разрушения клеточного монослоя оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ) [11]. С этой целью клетки инкубировали 1 ч с раствором МТТ (Calbiochem №475989, 0,5 мкг/мл) в физиологическом растворе. Лунки промывали и заливали 0,1 мл DMSO, после чего оптическую плотность клеток измеряли на микропланшетном ридере Victor² 1420 (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны 535 нм. На основании полученных данных рассчитывали концентрацию препарата в лунке, при которой происходит гибель 50% клеток монослоя (CC₅₀).

Противовирусное действие экстракта *in vitro*. Исследуемые образцы в объеме 100 мкл вносили в лунки планшетов с монослоем клеток MDCK. Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 1 ч. После этого в лунки вносили по 0,1 мл серийных десятикратных разведений соответствующего вируса в среде MEM (10⁻² — 10⁻⁷) и инкубировали в течение 48 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. По завершении экспериментов вирусную продукцию оценивали по реакции гемагглютинации. Для этого культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций с круглым дном, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали при 20°C в течение 1 ч, после чего визуально проводили учёт результатов. Титр вируса в присутствии каждой из концентраций экстракта и препарата сравнения определяли по методу Рида и Менча [12]. Противовирусную активность образцов оценивали по снижению титра вируса в опытных лунках планшетов по сравнению с контрольными. На основании полученных данных для каждого вируса и каждого образца рассчитывали значения 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀), т.е. концентрации вещества, снижающей титр вируса вдвое по сравнению с контролем, индекс селективности (SI) — отношение CC₅₀ к IC₅₀.

Протективная активность экстракта ладанника в опытах на животных. В исследовании был использован штамм вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, адаптированный к мышам. Перед экспериментом таблетки биологически активной добавки Форцис растирали в фарфоровой ступке, смешивали с физиологическим раствором из расчёта 2,5 мл на таблетку и из полученной суспензии готовили необходимые разведения для введения животным. Исследуемые образцы вводили животным перорально раз в день при помощи желудочного зонда в объёме 0,2–0,4 мл по лечебной (через 1, 2, 3, 4 и 5 дней после инфицирования), профилактической (за 24 и

за 1 ч до заражения) или лечебно-профилактической (за 24 и за 1 ч до заражения и через 1, 2, 3, 4 и 5 дней после инфицирования) схеме.

Мышей заражали интраназально под лёгким эфирным наркозом вирусом в дозе 5×10^3 TCID₅₀ на мышь в объёме 50 мкл (25 животных в группе). На 3-й день после заражения по 10 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали лёгкие. Лёгкие 5 животных использовали для выделения вируса (замораживали и хранили при -20°C до постановки соответствующих экспериментов), лёгкие остальных 5 животных фиксировали забуференным формалином и использовали для гистологического анализа (см. ниже).

Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали гибель животных в контрольной и опытных группах. На основании полученных данных рассчитывали процент гибели животных в каждой группе, индекс защиты каждого из образцов и среднюю продолжительность жизни животных в каждой из групп эксперимента.

Лёгкие, изолированные на третий день после заражения у 5 животных из каждой группы (см. выше), гомогенизировали с помощью прибора TissueLyserII (Qiagen, США) и определяли в гомогенатах инфекционную активность вируса. Для этого из гомогената лёгочной ткани готовили серию 10-кратных разведений (10^{-1} – 10^{-8}) на среде MEM и вносили их в лунки планшета с клетками MDCK. Планшеты инкубировали в течение 48 ч при 36°C в атмосфере 5% CO₂ и определяли в гомогенатах титр вируса, как описано выше.

Гистологический анализ. Для морфологического исследования лёгкие мышей фиксировали 10% формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, проводили через хлороформ, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилин-эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезжировали в спиртах нарастающей концентрации, проводили через две смены ксилола и заключали в бальзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах пневмонии, а также степень дегенеративных и пролиферативных процессов в ткани легких.

Анализ данных. Расчёт средних значений и ошибки среднего проводили при помощи пакета программ Statistica 8.0. Полученные результаты представляли в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$) или среднего $\pm$ ошибка эксперимента ($M \pm SE$). Нормальность распределения величин проводили при помощи критерия Колмогорова–Смирнова в пакете программ Statistica 8.0. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента в случае нормально распределённых величин и критерия Манна–Уитни при распределении, отличном от нормального. Достоверность различий в титрах вируса в лёгких проводили при помощи критерия Манна–Уитни, в выживаемости животных — при помощи анализа кривых выживаемости Каплана–Мейера по методу Манта–Хансена.

кэта программ Statistica 8.0. Достоверными считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05.

Результаты исследования

На первом этапе исследования для оценки диапазона рабочих концентраций была определена цитотоксичность исследуемого экстракта и препарата сравнения.

На основании полученных данных были рассчитаны 50% токсические концентрации для каждого из тестируемых веществ. Для экстракта ладанника эта величина составила 191 мкг/мл, для препарата сравнения, осельтамивира карбоксилата — >1 мкг/мл.

Результаты изучения противовирусной активности экстракта ладанника в отношении разных типов и подтипов вирусов гриппа суммированы в табл. 1.

Как следует из представленных результатов, препарат сравнения осельтамивира карбоксилат эффективно ингибировал репродукцию всех изученных вирусов за исключением вируса A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Эти данные согласуются с ранее полученными результатами, свидетельствующими об осельтамивир-устойчивости этого штамма и осельтамивир-чувствительности всех остальных использованных вирусов. Изучаемый экстракт в той или иной степени ингибировал все использованные вирусы. Наиболее чувствительными к нему оказались вирусы A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Для них значения IC₅₀ составили 0,5; 0,5 и 0,4 мкг/мл, а индексы селективности — 382, 382 и 478, соответственно, что характерно для препаратов с высокой противовирусной активностью. Вирусы гриппа типа В оказались менее чувствительны к действию экстракта. При этом эпидемически актуальные вирусы B/Malaysia/2506/04 и B/Florida/04/06 демонстрировали несколько более высокую чувствительность (SI=23 и 25, соответственно). Наименьшей чувствительностью к экстракту обладал вирус гриппа B/Lee/40 (IC₅₀=27,3 мкг/мл, SI=7).

На следующем этапе была изучена протективная активность экстракта ладанника в составе БАД Форцис на модели летальной гриппозной

Таблица 1. Показатели противовирусной активности химических соединений в культуре клеток MDCK

Вирус	Экстракт ладанника		Осельтамивира карбоксилат	
	IC ₅₀ , мкг/мл	SI	IC ₅₀ , мкг/мл	SI
A/California/07/09 (H1N1)pdm09	0,5	382	0,008	>125
A/Aichi/2/68 (H3N2)	0,6	318	0,013	>77
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	1,0	191	0,003	>333
A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	0,5	382	0,012	>83
A/Vladivostok/02/09 (H1N1)	0,4	478	$>0,3$	>3
B/Lee/40	27,3	7	0,091	>11
B/Malaysia/2506/04	8,4	23	0,026	>38
B/Florida/04/06	7,5	25	0,086	>12

пневмонии у белых мышей. Как было показано в ходе исследований, инфицирование вирусом гриппа приводило к развитию у животных патологического процесса. Внешние признаки заболевания проявлялись в ограничении подвижности животных, учащению и поверхностности дыхания, а также снижении потребления корма и воды, приводящему к потере массы тела и гибели животных. Перечисленные признаки являются типичными для гриппозной пневмонии.

Полученные данные были подтверждены при помощи анализа динамики гибели животных. Данные о динамике гибели животных в ходе гриппозной пневмонии представлены на рис. 1, а количественные показатели активности изучаемых соединений приведены в табл. 2.

Как следует из полученных результатов, инфицирование использованным вирусом приводило к гибели животных, начиная с 3 суток, достигая к концу эксперимента 67%. Использование препарата сравнения осельтамивира фосфата (Тамифлю) снижало этот показатель до 13,3% ($p=0,0028$), что соответствует индексу защиты (ИЗ) 80% и согласуется с имеющейся информацией о чувствительности использованного вируса к осельтамивиру.

Применение биологически активной добавки Форцис также снижало специфическую смертность животных: в дозе 25 мг/кг — до 53,3% (ИЗ=20%, $p=0,5194$), в дозе 50 мг/кг — до 40% (ИЗ=40%, $p=0,2534$), в дозе 100 мг/кг — также до 40% (ИЗ=40%, $p=0,1451$). Таким образом, не достигая достоверных различий, изучаемый обра-

зец, тем не менее, проявлял тенденцию к дозозависимому протективному эффекту при летальной гриппозной пневмонии. Кроме того, использование биологически активной добавки Форцис в максимальной из изученных доз (100 мг/кг) приводило к повышению продолжительности жизни животных примерно на сутки по сравнению с группой плацебо, что также можно трактовать как проявление той же тенденции.

Для комплексной характеристики противовирусных свойств биологически активной добавки Форцис было изучено её влияние на уровень репродукции вируса в ткани лёгких животных, инфицированных вирусом гриппа. С этой целью по 5 животных из каждой группы были эвтаназированы на 3-и сутки после заражения, и уровень вирусной активности в ткани их лёгких был оценен

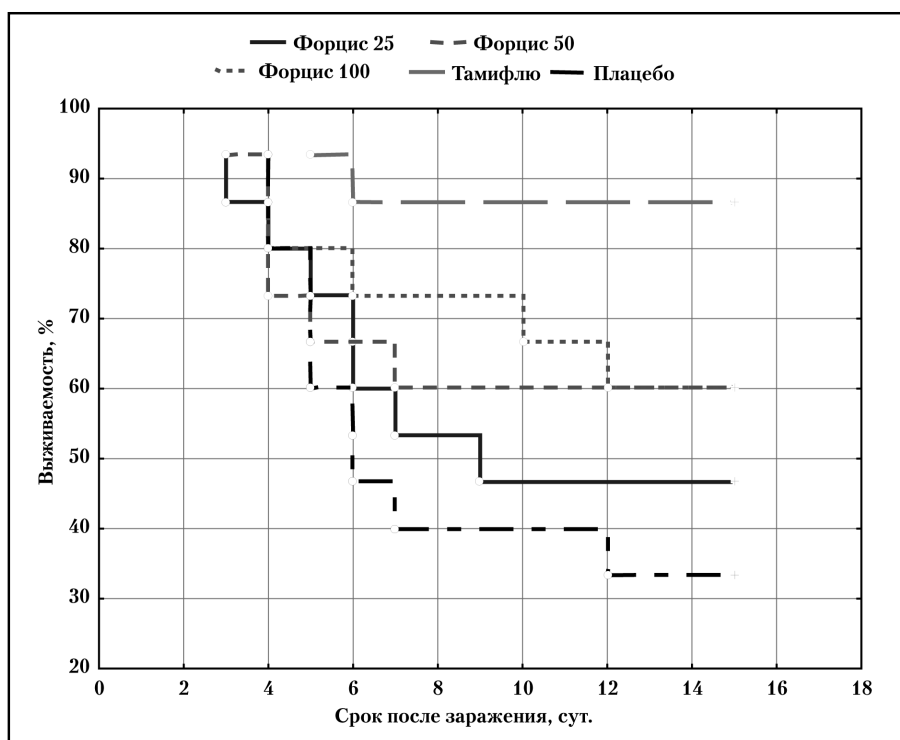


Рис. 1. Динамика гибели белых мышей в ходе экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения препарата Форцис (лечебно-профилактическая схема).

Таблица 2. Показатели протективной активности препарата Форцис (лечебно-профилактическая схема) в ходе экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09

Образец	Гибель животных (пало/заражено)	СПЖ, сут. (M±SE)	Смертность, %	Индекс защиты, %
Плацебо	10/15	5,8±0,8	66,7	0,0
Форцис 25 мг/кг	8/15	5,4±0,7	53,3	20,0
Форцис 50 мг/кг	6/15	4,5±0,6	40,0	40,0
Форцис 100 мг/кг	6/15	6,7±1,4	40,0	40,0
Тамифлю 20 мг/кг	2/15	5,5±0,5	13,3	80,0

Таблица 3. Репродукция вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 ($M \pm SD$) в ткани лёгких лабораторных животных на 3-и сутки после инфицирования в условиях применения биологически активной добавки Форцис.

Образец	Титр вируса ($\lg TCID_{50}/0,2 \text{ mL}$) ($M \pm SD$)	p
Форцис 25 мг/кг	$6,7 \pm 0,6$	0,6761
Форцис 50 мг/кг	$5,9 \pm 1,0$	0,1745
Форцис 100 мг/кг	$5,8 \pm 0,7$	0,0758
Тамифлю 20 мг/кг	$4,9 \pm 0,7$	0,0163
Плацебо	$6,8 \pm 0,8$	1,0000

Примечание. p – уровень достоверности при анализе при помощи критерия Манна–Уитни.

при помощи титрования на клетках. Данные по инфекционной активности вируса суммированы в табл. 3.

Как видно из представленных результатов, модельный вирус A/California/07/09 (H1N1)pdm09 эффективно размножался в ткани лёгких белых мышей, достигая через 72 ч после инфицирования титров $10^{6,8} TCID_{50}/0,2 \text{ mL}$. Применение препарата сравнения осельтамивира фосфата (Тамифлю) достоверно снижало этот показатель на 1,9 порядка, что согласуется с данными о чувствительности использованного вируса к осельтамивиру и свидетельствует о корректности использованной модели вирусной инфекции.

В лёгких мышей, получавших биологически активную добавку Форцис, активность вируса была заметно снижена лишь при использовании максимальной дозы образца. В этом случае снижение вирусной активности достигало 1 порядка, при этом достоверных отличий от группы плацебо не было обнаружено, хотя значения и были близки к ним ($p=0,0758$).

Для дополнительной характеристики влияния биологически активной добавки Форцис на патогенез гриппозной инфекции было проведено морфологическое исследование ткани лёгких животных в контрольных и опытных группах. В ходе исследований было показано, что лёгкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, клетки его выглядели интактными — в них не отмечалось признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических включений. В просветах бронхов не отмечалось экссудата и клеточного детрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели воздушными, альвеолярные стенки не были утолщены, из клеток инфильтрата в лёгочной паренхиме отмечались отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаруживалось (рис. 2).

У заражённых животных, не получавших лечения, морфологические изменения лёгочной ткани на 3-и сутки после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений

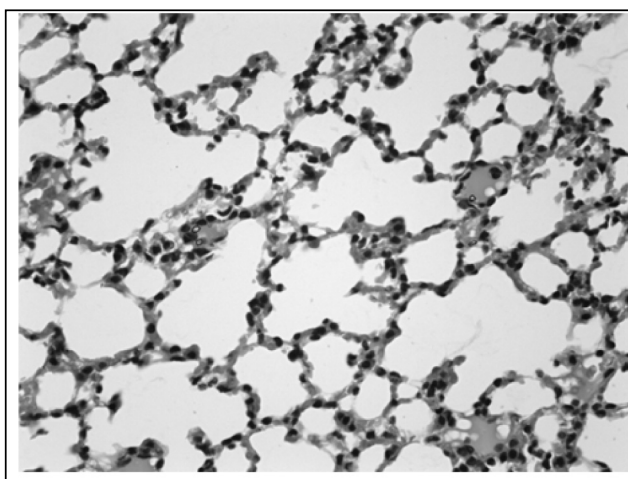


Рис. 2. Лёгкие интактной мыши.

Поражения эпителия и воспалительные инфильтраты отсутствуют, междольвеоларные перегородки тонкие. Гематоксилин-эозин, $\times 40$.

нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением пораженных клеток в просвет бронха. Базальная мембрана при этом обнажалась, что способствовало повышению её проницаемости и миграции в просвет бронхов и альвеол клеточных элементов. Эти процессы приводили к интенсивному серозному интерстициальному отёку, появлению очагов геморрагического отёка, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширением сосудов и спадением альвеол (рис. 3). Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии, и степень их выраженности, в частности степень дегенерации клеток бронхиального эпителия, может служить критерием для оценки тяжести процесса.

При использовании Тамифлю отличия морфологической структуры лёгких животных, прошедших лечение, от контрольной группы были сходными. Основное отличие от группы животных, не получавших лечения, заключалось в ограничении признаков вирусспецифического и реактивного поражения ткани лёгких на острой стадии грип-

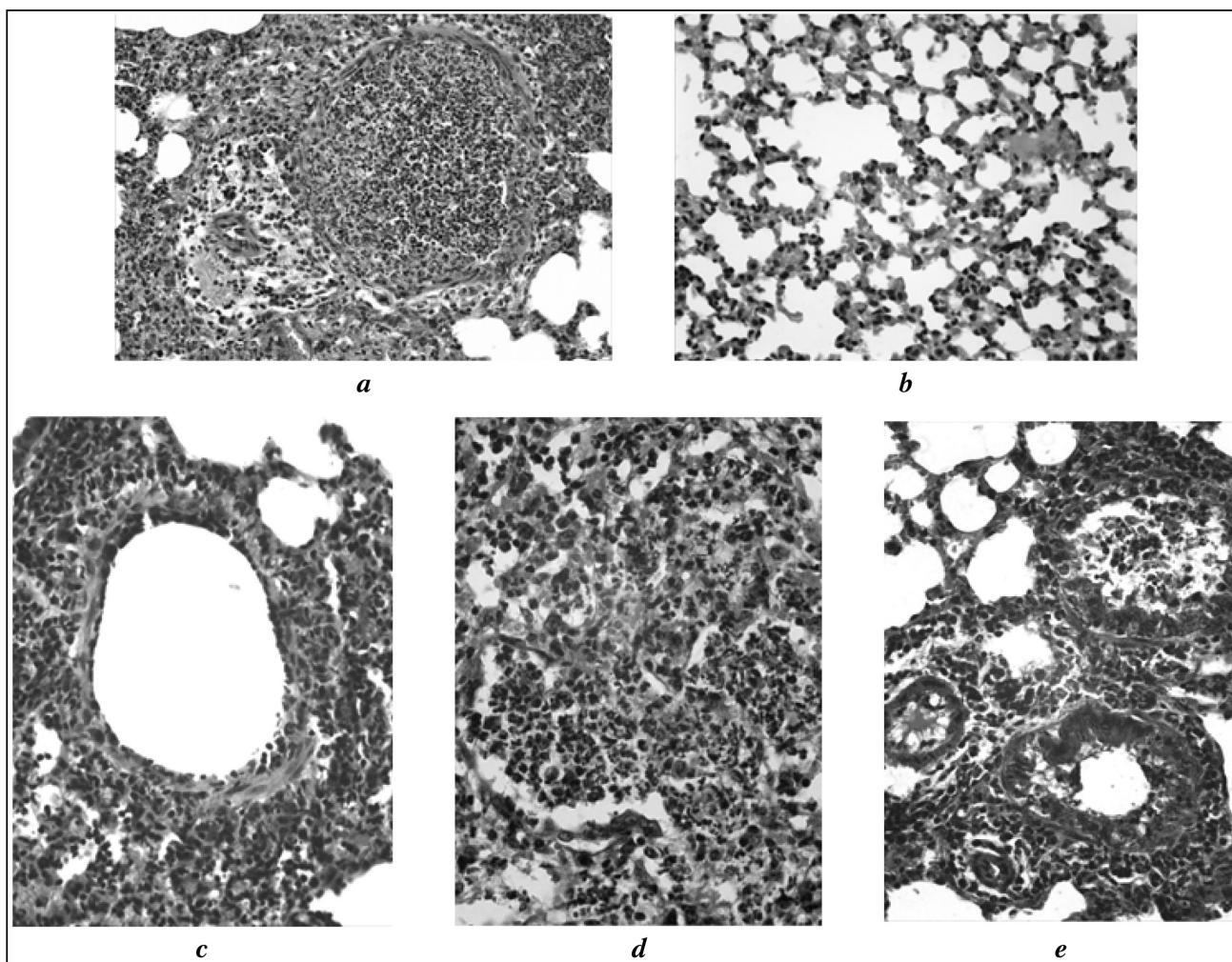


Рис. 3. Очаги гриппозной пневмонии в лёгком мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 без лечения (а) и в условиях применения Тамифлю (b), и биологически активной добавки Форцис в дозе 25 (с), 50 (d) и 100 (е) мг/кг.

Гематоксилин-эозин, $\times 240$.

позной пневмонии. Клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными (см. рис. 3, б), в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных животных. Сами очаги воспаления занимали меньшую по сравнению с контролем площадь. Альвеолярные стенки выглядели несколько утолщенными, клеток воспалительного инфильтрата практически не наблюдалось.

Применение биологически активной добавки Форцис приводило к умеренному ограничению степени поражения ткани лёгких, что проявлялось в некотором снижении степени воспалительной инфильтрации и клеточного распада, а также в уменьшении количества клеточного детрита в просветах бронхов (рис. 3, с—е).

На следующей стадии экспериментов была изучена активность биологически активной добавки Форцис в зависимости от режима применения. На данном этапе исследований *in vivo* использовался комбинированный (лечебно-профилактический), профилактический (за 24 и за 1 ч до заражения) и лечебный (через 1, 2, 3 и 4 сут после заражения) режимы при дозе образца 100 мг/кг в пересчёте на экстракт ладанника. Данные по оценке эффективности изученного образца в зависимости от режима применения суммированы в табл. 4 и представлены на рис. 4.

Анализ представленных результатов показал, что максимальная эффективность биологически активной добавки Форцис достигалась при комбинированном, лечебно-профилактическом, режиме её использования (ИЗ=37,5%, $p=0,1768$). Профилактический режим практически не приводил к протективному действию (ИЗ=12,5%, $p=0,9781$), при лечебном режиме отмечалось незначительное снижение гибели животных (ИЗ=25%, $p=0,3485$). Данные по инфекционной активности вируса в соответствующих группах животных суммированы в табл. 5.

Как видно из представленных результатов, лишь применение препарата сравнения осельта-

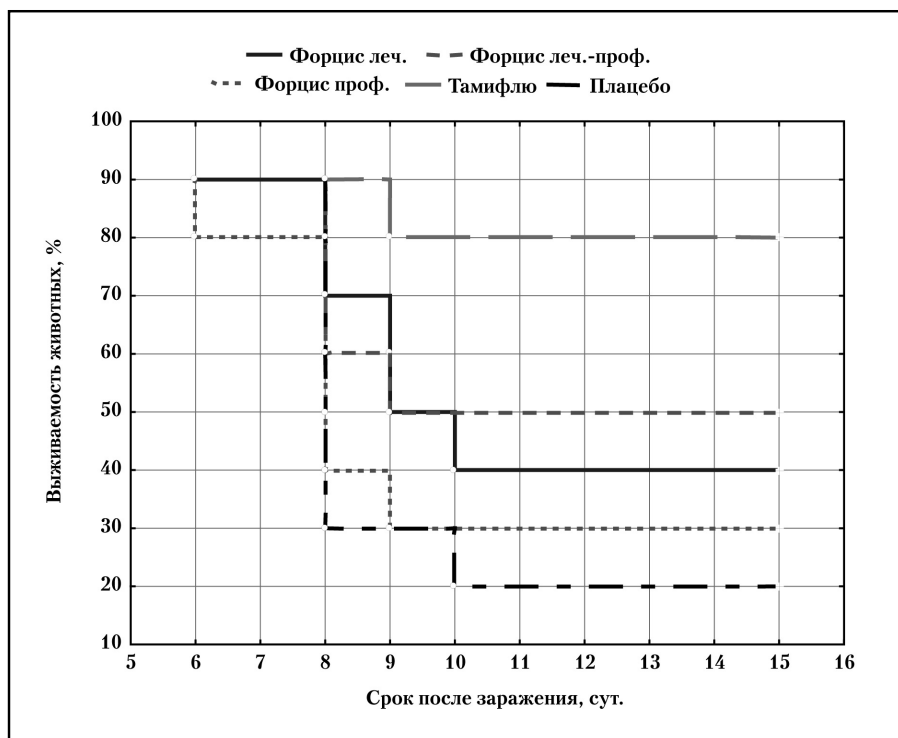


Рис. 4. Динамика гибели белых мышей в ходе экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения биологически активной добавки Форцис в зависимости от режима применения.

мивира фосфата (Тамифлю) достоверно снижало уровень репродукции вируса в ткани лёгких. Ни в одном случае использования биологически активной добавки Форцис достоверных отличий этого показателя от группы плацебо зафиксировано не было.

Таким образом, в результате проведённых исследований показан высокий уровень и широкий

спектр противогриппозной активности экстракта ладанника в клеточной культуре и его способность к снижению специфической смертности животных при гриппе примерно на 40%. Основным компонентом экстракта ладанника являются природные полифенольные соединения. На сегодняшний день известно более 8000 веществ этой группы [13]. Известно, что такие группы растительных полифенолов, как флавоны, катехины, флавононы, изофлавоны, антиоцианиды и другие классы флавоноидов (бифлавоны, халконы, ауруны, кумарины) [14], проявляют широкий спектр биологической активности. Сюда, в первую очередь, следует отнести антиоксидантное действие большинства соединений этого класса и их противовоспалительную актив-

Таблица 4. Показатели протективной активности препарата Форцис при экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, в зависимости от режима применения

Образец	Гибель животных (пало/заражено)	СПЖ, сут (M±SE)	Смертность, %	Индекс защиты, %
Плацебо	8/10	8,3±0,3	80,0	0,0
Форцис леч.	6/10	8,3±0,6	60,0	25,0
Форцис леч.-проф.	5/10	8,2±0,2	50,0	37,5
Форцис проф.	7/10	7,6±0,4	70,0	12,5
Тамифлю	2/10	8,5±0,5	20,0	75,0

Таблица 5. Репродукция вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (M±SD) в ткани лёгких лабораторных животных на 3-и сутки после инфицирования в условиях применения биологически активной добавки Форцис в зависимости от режима использования

Образец	Титр вируса (lgTCID ₅₀ /0,2 mL) (M±SD)	p
Форцис леч.	6,0±0,8	0,1779
Форцис леч.-проф.	6,0±1,1	0,2963
Форцис проф.	7,1±0,4	0,6015
Тамифлю	5,4±0,7	0,0367
Плацебо	6,7±0,9	1,0000

Примечание. p — уровень достоверности при анализе при помощи критерия Манна—Уитни.

многоколосника морщинистого *Agastache rugosa*, подавляет *in vitro* активность широкого спектра пикорнавирусов, включая риновирусы, коксакивирусы и полиовирусы [16]. 3-метилкверцетин (3-MQ), выделенный из экстракта молочая *Euphorbia grantii*, оказался противовирусным агентом, который подавлял репликацию полио-, коксаки- и риновирусов в концентрации ниже 10 мкг/мл. При дозе 20 мг/кг соединение защищало мышей от летальной инфекции вирусом Коксаки В4. Другие флавоноиды, экстрагированные из медицинских растений, включая 3-метилкемпферол и 3,4'-диметилкемпферол из *Psidia dentata*, подавляют синтез полиовирусной (+) РНК, а флавоноид из *Pterocaulon sphacelatum* обеспечивает защиту от ЦПД, вызванного полиовирусом [17, 18].

Ранее группой исследователей [19] было показано, что экстракт родственного растения, ладанника критского (*Cistus incanus*), ингибирует размножение вируса гриппа подтипа H5N1, блокируя процесс проникновения вириона в клетку. Было продемонстрировано, что такое действие достигается благодаря связыванию компонентов экстракта с гемагглютинином вируса. Этими же учёными [20] была показана протективная активность экстракта *Cistus incanus* на модели гриппозной инфекции у животных, причем наивысшие показатели защиты (порядка 50% снижения смертности) были достигнуты при аэрозольном применении экстракта. При пероральном способе применения показатели гибели животных не отличались от группы плацебо. Полученные данные позволили предполагать, что инактивация вируса экстрактом ладанника происходит посредством связывания

полифенольных соединений с поверхностными гликопротеидами вируса, что препятствует нормальному взаимодействию их с клеточными рецепторами. Результаты исследования послужили основой для клинического исследования экстракта, в котором была показана его патогенетическая активность у пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей [21].

В нашем исследовании на животных был использован именно пероральный способ применения экстракта, при котором показатели защиты составили 40%. При этом инфекционная активность вируса в ткани лёгких не снижалась по сравнению с группой плацебо. Можно предполагать, что в этом случае основной протективный эффект обусловлен не прямой противовирусной активностью полифенольных соединений, а их противовоспалительным или антиоксидантным действием, т.е. их активностью как средств патогенетической терапии. Известно, что для многих растительных полифенолов, в частности, флавоноидов, характерен низкий уровень биодоступности [22], что может препятствовать полному проявлению *in vivo* вирусингибирующих свойств, обнаруженных в опытах на клетках. Дальнейшие исследования в этом направлении могут дать более полное представление о механизмах противовирусной активности подобных композиций и способах их оптимального применения в профилактике и терапии гриппа. В частности, перспективным может оказаться оценка терапевтической и профилактической эффективности этой добавки в комбинации с другими этиотропными и патогенетическими препаратами, применяемыми при терапии гриппозной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahmed R., Oldstone M.B., Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat Immunol* 2007; 8: 1188–1193.
- Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res* 1998; 37: 83–95.
- Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. *Recomm Rep* 2011; 60: 1: 1–26.
- Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y. et al. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 882–887.
- Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M. et al. *In vitro* antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2517–2524.
- Smee D.F., Hurst B.L., Wong M.H. et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 126–133.
- Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 2009; 82: 95–102.
- Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza drug resistance. *Semin Respir Crit Care Med* 2011; 32: 409–422.
- Hauge S.H., Dudman S., Borgen K. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 155–162.
- Thorlund K., Awad T., Boivin G., Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 134.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 1–2: 55–63.
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493–497.
- Papaefthimiou D., Papanikolaou A., Falara V. et al. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem* 2014; 2: 35.
- Conti C., Mastromarino P., Goldoni P. et al. Synthesis and anti-rhinovirus properties of fluoro-substituted flavonoids. *Antivir Chem Chemother* 2005; 16: 267–276.
- Iranshahi M., Rezaee R., Parhiz H. et al. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci* 2015; 137: 125–132.
- Tait S., Salvati A.L., Desideri N., Fiore L. Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses. *Antiviral Res* 2006; 72: 252–255.
- Desideri N., Conti C., Sestili I. et al. *In vitro* evaluation of the anti-picornavirus activities of new synthetic flavonoids. *Antivir Chem Chemother* 1995; 6: 298–306.
- Desideri N., Olivieri S., Stein M.L. et al. Synthesis and anti-picornavirus activity of homo-isoflavonoids. *Antivir Chem Chemother* 1997; 8: 545–555.
- Ehrhardt C., Hrincius E.R., Korte V. et al. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 338–347.
- Droebner K., Ehrhardt C., Poetter A. et al. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 1–10.

21. *Kalus U., Grigorov A., Kadecki O. et al.* Cistus incanus (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res* 2009; 84: 3: 267—271.

22. *Manach C., Scalbert A., Morand C. et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727—747.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лаврентьева Ирина Николаевна — д.м.н., заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Сухобаевская Лариса Петровна — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Зарубаев Владимир Викторович — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Влияние цефтриаксона на состав пристеночной и полостной микрофлоры тонкого кишечника крыс линии Вистар

А. В. СУСЛОВ*, Е. Ф. СЕМЁНОВА, А. Н. МИТРОШИН, И. Я. МОИСЕЕВА

Пензенский государственный университет, Пенза

The Effect of Ceftriaxone on the Composition of the Parietal and Cavity Microflora of the Small Intestine of Wistar Rats

A. V. SUSLOV, E. F. SEMYONOVA, A. N. MITROSHIN, I. YA. MOISEYEVA

Penza State University, Penza

Изучен качественный и количественный состав полостной и пристеночной микрофлоры тонкого кишечника под влиянием цефтриаксона в динамике месячного эксперимента на животных. Исследование проведено на крысах линии Вистар, разделённых на две группы. Контрольная группа ($n=50$) — животным ежедневно на внутримышечно вводили физиологический раствор 1,0 мл в течение 10 дней. Опытная группа ($n=50$) — животным ежедневно внутримышечно вводили цефтриаксон 15 мг/кг/сут в течение 10 дней. Кишечное содержимое от дистальной трети тонкой кишки направляли на бактериологическое исследование. Исследуемый материал засевали на питательные среды для выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ, в том числе псевдомонад), энтеробактерий, бифидобактерий, лактобактерий, клостридий, эшерихий, энтерококков, стафилококков, дрожжеподобных грибов. Антибактериальная терапия цефтриаксоном вызывает более выраженные изменения в пристеночной микрофлоре тонкого кишечника. После курса антибактериальной терапии полостная микрофлора восстанавливается быстрее пристеночной (в частности, количество бифидо- и лактобактерий). Выявлено увеличение частоты встречаемости *E.coli* с типичными ферментативными свойствами в тонкой кишке (до 10^3 – 10^5 КОЕ/г), особенно в пристеночной микрофлоре. Цефтриаксон приводит к количественному росту условно-патогенных энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий в период после курса антибактериальной терапии.

Ключевые слова: антибактериальная терапия, эксперимент, влияние, качественный и количественный состав полостной и пристеночной микрофлоры кишечника.

The study examined the qualitative and the quantitative composition of the cavity and parietal microflora of the small intestine under the influence of ceftriaxone in the monthly experiment on animals. The study was carried out on Wistar rats, divided into two groups. Control group ($n=50$) — animals were injected intramuscularly with a 1.0 ml physiological solution daily for 10 days. Experimental group ($n=50$) — animals were injected intramuscularly with ceftriaxone 15 mg/kg/day, daily for 10 days. Intestinal contents from the distal third of the small intestine were sent for a bacteriological study. The investigated material was inoculated on nutrient media to isolate nonfermenting gram-negative bacteria (NGNB, including pseudomonads), enterobacteria, bifidobacteria, lactobacilli, clostridia, escherichia, enterococci, staphylococci, yeast-like fungi. Antibacterial therapy with ceftriaxone causes more pronounced changes in the parietal microflora of the small intestine. After a course of antibacterial therapy, the cavity microflora is restored faster than the parietal microflora (in particular, the amount of bifido- and lactobacilli). An increase in the incidence of *E.coli* with typical enzymatic properties in the small intestine (up to 10^3 – 10^5 cfu/g) has been revealed, especially in the parietal microflora. Ceftriaxone leads to a quantitative increase in opportunistic enterobacteria and non-fermenting gram-negative bacteria after the course of antibiotic therapy.

Keywords: antibacterial therapy, experiment, influence, qualitative and quantitative composition of the cavity and parietal microflora of the intestine.

Введение

В связи с широким использованием антибиотиков в клинической практике необходимо особо относиться к оценке рисков, связанных с антибактериальной терапией, в частности, эпидемиологии устойчивости к антибиотикам возбудителей осложнённых интраабдоминальных инфекций (ИАИ);

активности клинически применяемых антимикробных препаратов в отношении ключевых бактериальных возбудителей инфекций человека. Также актуальны вопросы применения цефалоспоринов III поколения с точки зрения принципов рациональной антибиотикотерапии, национальных данных по чувствительности возбудителей к антибиотикам и доказательных данных, полученных в результате качественных клинических исследований [1–3].

Исследования последних лет позволяют предположить тесную взаимосвязь многих нозо-

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: E-mail: dr.suslov@rambler.ru

логий с состоянием микробиотопов человека. Всё чаще они подтверждают взаимосвязь работы иммунной системы с составом микробиоты кишечника, количественные и качественные изменения которого могут индуцировать или подавлять вялотекущее воспаление и тем самым, влиять на развитие как инфекционных, так и неинфекционных заболеваний [4, 5].

В настоящее время наиболее активно изучается динамика состава микрофлоры (в основном, содержимого) толстого кишечника, в то время, как тонкому кишечнику не уделяется должного внимания. Однако учитывая, что влияние микроорганизмов носит комплексный характер, представляет интерес провести сравнительный микробиологический мониторинг пристеночной и полостной микрофлоры этого отдела желудочно-кишечного тракта в норме и при терапии цефтриаксоном.

Цель исследования — изучить качественный и количественный состав микрофлоры тонкого кишечника под влиянием цефтриаксона в динамике месячного эксперимента на животных.

Материал и методы

Экспериментальное исследование было проведено на крысах линии Вистар, в возрасте 5 мес, массой около 250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с санитарными нормами, предусмотренными «Правилами лабораторной практики». За два месяца до исследования они переводились на унифицированный рацион питания [6].

Животные были разделены на 3 группы. Первая группа ($n=10$) — животные перед введением антибиотика были выведены из эксперимента, полученные от них данные использовались в качестве нормы. Контрольная группа ($n=50$) — животным ежедневно, на протяжении 10 дней внутримышечно вводили физиологический раствор 1,0 мл. Опытная группа ($n=50$) — животным ежедневно, на протяжении 10 дней внутримышечно вводили цефтриаксон 15 мг/кг/сут.

В динамике наблюдения (1-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25- и 30-е сутки) в стерильных условиях осуществлялся забор биоматериала (кишечного содержимого и стенки кишечника) от дистальной трети тонкой кишки на бактериологическое исследование. Исследуемый материал засевали на питательные среды в соответствии с правилами, изложенными в методических указаниях [7]. Использовались традиционные питательные среды для выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ, в том числе псевдомонад), энтеробактерий, бифидобактерий, лактобактерий, клостридий, эшерихий, энтерококков, стафилококков, дрожжеподобных грибов [8].

Культивирование бактерий проводили при температуре 37°C, в течение 18–24 ч, грибов при 30°C в течение 1–7 сут. Биохимическую идентификацию осуществляли в автоматизированном режиме на тест-системах производства BioMerieux, включающих до 47 анализируемых признаков и свойств [9]. Общее количество микробных клеток в пересчёте на 1 г фекалий животных подсчитывали в камере Горяева. Количество живых микроорганизмов (КОЕ) в суспензиях фекалий животных определяли путём высева соответствующих десятикратных серийных разведений на плотные питательные среды и подсчётом выросших колоний.

При антимикробной терапии использовали антибиотик III поколения цефалоспоринового ряда широкого спектра действия для парентерального введения — цефтриаксон (6R-бальфа, 7β(Z)-7-2-амино-4-тиазолил(метокси-имино)ацетиламино-8-оксо-3-(1,2,5,6-тетрагидро-2-метил-5,6-диоксо-

1,2,4-триазин-3-ил)тиометил-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота) — препарат в виде натриевой соли фирмы ОАО «Биосинтез».

Статистический анализ результатов исследования осуществляли с использованием программ Excel (Microsoft, США) и пакета Statistica 6.0 [10, 11].

Результаты исследования

Высев биосубстрата на питательные среды в разведениях позволил установить не только присутствие определённых групп и видов микроорганизмов, но и их количественные характеристики.

Микробиологический мониторинг полостной микрофлоры тонкого кишечника в течение месяца показал преобладание лактобактерий и энтерококков (табл. 1). При этом содержание лактобактерий характеризовалось слабым варьированием в течение всего периода наблюдения ($CV=7,1\%$). Очень сильно изменялось количество *Enterococcus faecalis* ($Lim=1-10^7$ КОЕ/г) и относительно умеренно — кишечных палочек с типичными ферментативными свойствами ($Lim=10^2-0^4$ КОЕ/г).

Сильно варьировал качественный и количественный состав неферментирующих грамотрицательных бактерий, включающий *Pseudomonas fluorescens* и *P.aeruginosa*. Не были выявлены условно-патогенные энтеробактерии, а также *Staphylococcus aureus* и *Candida spp.*, не характерные для нормальной микрофлоры.

Мониторинг пристеночной микрофлоры тонкого кишечника показал преобладание бифидобактерий, лактобактерий и *Enterococcus faecalis* (табл. 2). При этом количество лактобактерий и энтерококков характеризовалось слабым и сильным варьированием в течение всего периода наблюдения ($CV=8,2\%$ и $CV=105,4\%$, соответственно).

Очень сильно изменялось количество и качество кишечных палочек с атипичными свойствами: гемолитическими и лактозоположительными ($CV=115,6-282,3\%$). Сильно варьировал качественный и количественный состав неферментирующих грамотрицательных бактерий, включающий *P.fluorescens* и *P.aeruginosa* ($Lim=1-10^3$ КОЕ/г). Не определялись условно-патогенные энтеробактерии, *S.aureus* и *Candida spp.*

Под влиянием цефтриаксона в просвете тонкого кишечника не было установлено снижения количества бифидобактерий на протяжении всего периода исследования (во время и после курса антибактериальной терапии) (табл. 3). Содержание лактобактерий во время антибактериальной терапии было ниже на 1 порядок относительно контроля, после антибиотикотерапии к 30-м суткам эксперимента (20-е сутки после курса антибактериальной терапии) содержание бактерий достигло нормы.

Количество *Enterococcus faecalis* на фоне антибактериальной терапии не отличалось от контроля и, в целом, отражало динамику по снижению как в

Таблица 1. Вариабельность состава полостной микрофлоры тонкого кишечника крыс линии Вистар в контроле, 10⁶ КОЕ/г

Сроки отбора материала для исследования, сутки	Бифидо-бактерии	Лакто-бактерии	<i>Enterococcus faecalis</i>	Клюстридии	<i>E.coli</i> с типичными ферментативными свойствами	<i>E.coli</i> гемолитическая	Другие энтеро-бактерии	<i>S.aureus</i>	<i>S.lentus</i>	<i>Candida</i> spp.	Неферментирующие грамотрицательные бактерии
Норма	3	8	7	1	2	—	—	—	4	—	2*
5-е	3	8	5	1	2	—	—	—	4	—	—
10-е	3	7	5	1	4	—	—	—	4	—	—
15-е	3	8	4	1	3	—	—	—	3	—	—
20-е	3	8	3	1	2	—	—	—	3	—	—
25-е	3	7	2	1	2	—	—	—	4	—	1**
30-е	3	7	1	1	4	—	—	—	4	—	4**
Статистические показатели											
Пределы варьирования, Lim	3	7–8	1–7	1	2–4	0	0	0	3–4	0	0–4
CV, %	0	7,1	52,2	0	35,2	0	0	0	25,8	0	152,6

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – степень числа 10; CV – коэффициент вариации; л+ – лактозоположительная реакция; «–» – не обнаружены; * – *P. fluorescens*; ** – *P. aeruginosa*.

Таблица 2. Вариабельность состава пристеночной микрофлоры тонкого кишечника крыс линии Вистар в контроле, 10⁶ КОЕ/г

Сроки отбора материала для исследования, сутки	Бифидо-бактерии	Лакто-бактерии	<i>Enterococcus faecalis</i>	Клюстридии	<i>E.coli</i> с типичными ферментативными свойствами	<i>E.coli</i> гемолитическая	Другие энтеро-бактерии	<i>S.aureus</i>	<i>S.lentus</i>	<i>Candida</i> spp.	Неферментирующие грамотрицательные бактерии
Норма	5	7	4	1	1	—	—	—	3	—	2*
5-е	5	7	5	1	1	—	—	—	7	—	3*
10-е	5	7	5	1	2	—	—	—	3	—	—
15-е	5	6	4	1	1	1	—	—	3	—	—
20-е	5	7	3	1	2	1	—	—	4	—	—
25-е	5	7	3	1	1	2	—	—	4	—	2**
30-е	5	6	3	1	1	3	л+	—	4	—	2**
Статистические показатели											
Пределы варьирования, Lim	5	6–7	3–5	1	1–2	0–3	0–4	0	3–7	0	0–3
CV, %	0	8,2	105,4	0	37,7	282,3	115,6	0	35,4	0	65,6

группе контроля, так и в опытной группе. Наибольшей изменчивости были подвержены *E.coli* с типичными ферментативными свойствами в период антибактериальной терапии ($\text{Lim}=10^2\text{--}10^5$ КОЕ/г), установлено увеличение их количества на 3 порядка относительно контроля. В период после антибактериальной терапии наблюдалась динамика по снижению количества бактерий, однако к концу эксперимента (20-е сутки после антибактериальной терапии) показатели нормы не были достигнуты. В ходе исследования лактозонегативная и гемолитическая *E.coli* не обнаруживались. Установлено резкое увеличение после курсовой антибиотикотерапии (спустя 3 недели) количества *P.aeruginosa* (до 10^6 КОЕ/г) и *P.vulgaris* (до 10^2 КОЕ/г).

Полученные в ходе исследования экспериментальные данные свидетельствуют о влиянии антибактериальной терапии на состав пристеночной микрофлоры кишечника, начиная уже с первых суток эксперимента (табл. 4).

Установлено, что наибольшей изменчивости были подвержены *E.coli*, энтерококки, бифидо- и лактобактерии в период антибиотикотерапии. Так, содержание бифидо- и лактобактерий на фоне антибактериальной терапии было ниже контроля на 2 порядка ($\text{Lim}=10^3\text{--}10^5$ и $10^5\text{--}10^7$ КОЕ/г, соответственно). *E.coli* с атипичными ферментативными и гемолитическими свойствами не обнаружены, установлен рост (на 2 порядка) количества *E.coli* с типичными ферментативными свойствами после завершения

Таблица 3. Вариабельность состава полостной микрофлоры тонкого кишечника крыс линии Вистар при воздействии цефтриаксоном, 10⁶ КОЕ/г

Сроки отбора материала для исследования, сутки	Бифидобактерии	Лактобактерии	Лакто-бактерии	<i>Enterococcus faecalis</i>	Клюстридии	<i>E.coli</i> с типичными ферментативными свойствами	<i>E.coli</i> лактозо-негативная	<i>E.coli</i> гемолитическая	Другие энтеробактерии	<i>S.aureus</i>	<i>S.lentus</i>	<i>Candida</i> spp.	Неферментирующие грамотрицательные бактерии
Норма	3	8	7	1	2	—	—	—	—	—	4	—	2**
5	3	7	6	1	4	—	—	—	—	—	4	—	—
10	3	7	5	1	5	—	—	—	—	—	6	—	—
15	3	8	5	1	3	—	—	—	—	—	5	—	—
20	3	7	4	1	3	—	—	—	—	—	5	—	—
25	3	8	3	1	3	—	—	—	1*	—	5	—	3***
30	3	8	1	1	3	—	—	—	2*	—	5	—	6***
Статистические показатели													
Пределы варьирования, Lim	3	7–8	1–7	1	2–5	0	0	0	0–2	0	4–6	0	0–6
CV, %	0	7,1	110,6	0	69,1	0	0	0	441,5	0	34,6	0	351,9

Примечание. Здесь и в табл. 4: n – степень числа 10; CV – коэффициент вариации; «–» – не обнаружены; * – *P. vulgaris*; ** – *P. fluorescens*; *** – *P. aeruginosa*.

Таблица 4. Вариабельность состава пристеночной микрофлоры тонкого кишечника крыс линии Вистар при воздействии цефтриаксоном, 10⁶ КОЕ/г

Сроки отбора материала для исследования, сутки	Бифидобактерии	Лактобактерии	Лакто-бактерии	<i>Enterococcus faecalis</i>	Клюстридии	<i>E.coli</i> с типичными ферментативными свойствами	<i>E.coli</i> лактозо-негативная	<i>E.coli</i> гемолитическая	Другие энтеробактерии	<i>S.aureus</i>	<i>S.lentus</i>	<i>Candida</i> spp.	Неферментирующие грамотрицательные бактерии
Норма	5	7	4	1	1	—	—	—	—	—	3	—	2***
5	3	6	1	1	1	—	—	—	4*	—	5	—	—
10	3	5	1	1	1	—	—	—	—	—	4	—	—
15	3	6	3	1	3	—	—	—	—	—	4	—	—
20	5	6	2	1	3	—	—	—	—	—	4	—	—
25	5	5	2	1	3	—	—	—	1**	—	4	—	2****
30	5	6	1	1	3	—	—	—	2**	—	4	—	4****
Статистические показатели													
Пределы варьирования, Lim	3–5	5–7	1–4	1	1–3	0	0	0	0–4	0	3–5	0	0–4
CV, %	63,9	13,2	141,4	0	124,8	0	0	0	374,2	0	35,4	0	349,7

курса антибактериальной терапии (Lim=10–10³ КОЕ/г). Количество энтерококков в динамике эксперимента было ниже контроля на 2 порядка в период антибактериальной терапии, и на 1 порядок — после антибиотикотерапии.

В исследовании установлено резкое увеличение после 10-дневной курсовой антибиотикотерапии (на 15-е и 20-е сутки после курса антибактериальной терапии) количества условно-патогенных энтеробактерий, в том числе *P. vulgaris* (до 10²–10⁴ КОЕ/г, соответственно) и неферментирующих грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* (до 10⁴ КОЕ/г). Не были выявлены *S. aureus* и *Candida* spp.

Заключение

Сравнительный микробиологический мониторинг содержимого тонкой кишки крыс линии Вистар свидетельствует о существенной вариабельности качественного и количественного состава некоторых групп бактерий: неферментирующих грамотрицательных, включая различные виды *Pseudomonas*; энтеробактерий, включая различные хемо- и биовары *E. coli*; условно-патогенных энтеробактерий *P. vulgaris*. Не обнаружены в кишечнике экспериментальных животных дрожжеподобные грибы рода *Candida*, не являющиеся представителями нормальной микрофлоры крыс.

В ходе исследования влияния цефтриаксона на микробиоту тонкой кишки установлены как схожие изменения качественного и количественного микробного состава полостной и пристеночной микрофлоры, так и их существенные различия. Так, количественные изменения пристеночной микробиоты более выражены, относительно полостной, что наиболее характерно для бифидобакте-

рий, *E.faecalis* и *E.coli* с типичными ферментативными свойствами. Качественный состав микрофлоры пристеночной и полостной микрофлоры в динамике эксперимента не отличался.

Анализируя динамику восстановления кишечной микрофлоры после курса антибактериальной терапии установлено, что полостная микрофлора восстанавливается быстрее пристеночной (бифидо- и лактобактерии), однако следует учитывать, что полостная микрофлора была и меньше подвержена изменению при антибиотикотерапии.

В исследовании установлено изменение количественного и качественного состава *E.coli* пристеночной микрофлоры: до курса антибактериальной терапии в пристеночном слое микробиоты выявлены кишечные палочки с атипичными свойствами — гемолитический биовари лактозоположительный хемовар *E.coli*. В период после курса антибактериальной терапии атипичных *E.coli* не обнаружено, но увеличилось количество *E.coli* с типичными ферментативными свойствами.

Следует отметить, что на фоне антибактериальной терапии (фактически спустя 15 суток после проведения антибиотикотерапии), в составе пристеночной и полостной микрофлоры установлен количественный рост условно-патогенных энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий, что может свидетельствовать

о создании благоприятных условий для их развития. Увеличение доли указанных бактерий стало возможно за счёт отсутствия чувствительности к антибиотикам (цефтриаксонорезистентности) и снижения количества *E.faecalis* и *S.lentus*.

Выводы

Антибактериальная терапия цефтриаксоном вызывает более выраженные качественные и количественные изменения в пристеночной микрофлоре тонкого кишечника, в то время как полостная микрофлора изменяется в меньшей степени. После курса антибактериальной терапии полостная микрофлора восстанавливается быстрее пристеночной (в частности, количество бифидо- и лактобактерий). Также установлено увеличение частоты встречаемости *E.coli* с типичными ферментативными свойствами в тонкой кишке (до 10^3 – 10^5 КОЕ/г), особенно характерное для пристеночной микрофлоры. Цефтриаксонотерапия приводит к количественному росту условно-патогенных энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий в период после её проведения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-34-60130мол_а_дк.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ткаченко Е. И., Суворова А. Н. Дисбактериоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: ИнформМед, 2009; 276. / *Tkachenko E. I., Suvorova A. N. Disbakterioz kishchnika. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniju. 2-e izd., ispr. i dop. SPb.: InformMed, 2009; 276. [in Russian]*
2. Яковлев С.В., Проценко Д.Н., Шахова Т.В. и др. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? Антибиотики и химиотерапия 2010; 55: 1–2: 50–58. / *Jakovlev S.V., Procenko D.N., Shahova T.V. i dr. Antibiotikorezistentnost' v stacionare: kontroliruem li my situaciju? Antibiotiki i khimioterapija 2010; 55: 1–2: 50–58. [in Russian]*
3. Белобородова Н.В., Тараканов В.А., Барова Н.К. Анализ причин деструктивных пневмоний у детей и возможности оптимизации антимикробной терапии. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2016; 95: 2: 66–71. / *Beloborodova N.V., Tarakanov V.A., Barova N.K. Analiz prichin destruktivnyh pnevmonij u detej i vozmozhnosti optimizacii antimikrobnogo terapii. Pediatrija. Zhurnal im. G.N. Speranskogo. 2016; 95: 2: 66–71. [in Russian]*
4. Урсова Н.И. Иммунологическая функция интестинальной микрофлоры, ее нарушения и возможности коррекции. Альманах клин мед 2015; 40: 35–46. / *Ursova N.I. Immunologicheskaja funkcija intestinal'noj mikroflory, ee narushenija i vozmozhnosti korrekicii. Al'manah klin med 2015; 40: 35–46. [in Russian]*
5. Pelloquin J.M., Nguyen D.D. The microbiota and inflammatory bowel disease: in sights from animal models. Anaerobe. 2013 Dec; 24: 102–106. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.04.006. Epub 2013 Apr.
6. Суслов А.В., Семенова Е.Ф., Маркелова Н.Н., Смолькова Ю.Е., Митрошин А.Н., Моисеева И.Я. Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника крыс линии Вистар. Успехи совр науки 2016; 10: 6: 55–59. / *Suslov A.V., Semenova E.F., Markelova N.N.,*

- Smol'kova Ju.E., Mitroshin A.N., Moiseeva I.Ja. Kachestvennyj i kolichestvennyj sostav mikroflory kishchnika krys linii Vistar. Uspехи sovrx nauki 2016; 10: 6: 55–59 [in Russian]*
7. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания. МУ 4.2.2039-05. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2006; 398. / *Metody kontrolja. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory. Tehnika sbora i transportirovanija biomaterialov v mikrobiologicheskie laboratorii. Metodicheskie ukazanija. MU 4.2.2039-05. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora. 2006; 398. [in Russian]*
8. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб.: ЭЛБИ-СПб.: 2008; 352. / *Poljak M.S., Suharevich V.I., Suharevich M.Je. Pitatel'nye sredy dlja medicinskoj i sanitarnoj mikrobiologii. SPb.: JeLBI- SPb.: 2008; 352. [in Russian]*
9. Скала Л.З., Лукин И.Н. Система микробиологического мониторинга «Микроб-2». Программное обеспечение. Версия 1.25, 2006–2009. Руководство пользователя. М.: МедПроект-3, 2011; 60. / *Skala L.Z., Lukin I.N. Sistema mikrobiologicheskogo monitoringa «Mikrob-2». Programmnoe obespechenie. Versija 1.25, 2006-2009. Rukovodstvo pol'zovatelja. M.: MedProekt-3, 2011; 60. [in Russian]*
10. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012; 384. / *Truhachjova N.V. Matematicheskaja statistika v mediko-biologicheskix issledovanijah s primeneniem paketa Statistica. M.: GJeOTAR-Media, 2012; 384. [in Russian]*
11. Яковлев В. Б. Статистика. Расчёты в Microsoft Excel. М.: «Колос С», 2005; 350. / *Jakovlev V. B. Statistika. Raschjoty v Microsoft Excel. M.: «Kolos S», 2005; 350. [in Russian]*

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Суслов Андрей Владимирович — к. м. н., ассистент кафедры «Хирургия», Медицинский институт, ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Пенза

Семенова Елена Федоровна — к. б. н., профессор кафедры «Общая и клиническая фармакология», Медицинский институт, ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Пенза

Митрошин Александр Николаевич — д. м. н., профессор, зав. кафедрой «Хирургия», Медицинский институт, ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Пенза

Моисеева Инесса Яковлевна — д. м. н., профессор, зав. кафедрой «Общая и клиническая фармакология», Медицинский институт, ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Москва

Молекулярно-генетическое типирование энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных от больных гемобластозами

А. Г. КОРОБОВА*, С. А. ХРУЛЬНОВА, В. А. ОХМАТ, Г. А. КЛЯСОВА

Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

Molecular-Genetic Typing of Enterobacteriaceae Producing an Extended Spectrum Beta-Lactamase in Patients with Hemoblastoses

A. G. KOROBOVA, S. A. KHRULNOVA, V. A. OKHMAT, G. A. KLYASOVA

Hematology Research Center, Moscow

Цель исследования — определить основные механизмы инфицирования энтеробактериями с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у гематологических больных. **Материал и методы.** В проспективное исследование (2013—2015 гг.) были включены случаи бактериемии, вызванные энтеробактериями. Мазки со слизистой оболочки прямой кишки брали в течение первых трёх суток после получения гемокультуры. Для детекции БЛРС были использованы фенотипические методы. Гены резистентности групп *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} и *bla*_{CTX-M} определяли методом ПЦР. Генотипирование проводили методом ERIC-ПЦР. **Результаты.** В 89 случаях бактериемии был выделен 91 изолят энтеробактерий (56% — *E. coli*, 26% — *K. pneumoniae*, 18% — другие) у 82 больных (медиана возраста 50 лет). Продукция БЛРС была у 19 (21%) изолятов (*E. coli* — *n*=11, *K. pneumoniae* — *n*=8). Бета-лактамазы CTX-M типа были определены у 95% изолятов. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки, идентичными по виду энтеробактериями с продукцией БЛРС, была во всех 19 случаях бактериемии, вызванной БЛРС положительными энтеробактериями, и только в 8 (11%) из 72 при выделении из гемокультуры энтеробактерий без продукции БЛРС (*P*<0,0001). Генотипирование 19 продуцентов БЛРС из гемокультуры выявило генетическую идентичность только у двух изолятов *E. coli*, выделенных от одного пациента с интервалом в два месяца. При попарном генотипировании продуцентов БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, генетически родственными были 26% пар изолятов. **Заключение.** У больных с опухолями системы крови и бактериемией, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС, преобладает эндогенный путь инфицирования.

Ключевые слова: Enterobacteriaceae, БЛРС; CTX-M, бактериемия, колонизация, генотипирование.

The aim of this study was to determine the prevalent path of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae transmission in hematological patients. **Methods.** Prospective study was performed from 2013 to 2015 and included cases of bacteremia caused by Enterobacteriaceae. Rectal swabs were taken within the first three days after positive blood culture. ESBL-production was confirmed by phenotypic tests. The genes of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} were determined by PCR. Genotyping was performed by ERIC-PCR. **Results.** A total of 91 enterobacteria isolates (56% — *E. coli*, 26% — *K. pneumoniae*, 18% — other) derived from blood were obtained in 89 cases of bacteremia in 82 patients (median age — 50 years). Production of ESBL was found in 19 (21%) isolates (*E. coli* — *n*=11, *K. pneumoniae* *n*=8). Beta-lactamase CTX-M type was identified in 95% of isolates. Colonization of gut with the same species was detected in all 19 episodes of bacteremia caused by ESBL positive isolates and only in 8 (11%) of 72 episodes of bacteremia caused ESBL-negative isolates (*P*<0.0001). Genotyping of 19 ESBL producers from blood culture revealed a genetic identity of only two isolates of *E. coli*, taken from the same patient within two months. Genetically related isolates from blood and gut in the same patients were identified in 26% of the pairs. **Conclusion.** The endogenous path of infection caused by ESBL producing Enterobacteriaceae prevailed in patients with hematological malignancies.

Keywords: Enterobacteriaceae; ESBL; CTX-M; bacteremia; colonization; genotyping.

Введение

В последние годы в этиологии инфекционных осложнений у больных опухолями системы крови отмечается увеличение доли полирезистентных бактерий, среди которых ведущую позицию занимают энтеробактерии с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) [1]. В России доля БЛРС-положительных энтеробактерий из гемо-

культуры у больных гемобластозами составляет 43% [2]. Распространение энтеробактерий с продукцией БЛРС представляет серьёзную проблему, так как в отношении их активность проявляют ограниченное число антимикробных препаратов.

Развитие тяжёлых инфекционных осложнений у иммунокомпрометированных больных происходит как при эндогенном, так и при экзогенном варианте инфицирования микроорганизмами. Эндогенная транслокация бактерий возникает, как правило, через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, повреждаемую

© Коллектив авторов, 2017

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

цитостатическими препаратами или опухолью. Экзогенная передача внутрибольничных возбудителей происходит из окружающей среды или от пациента к пациенту. Этому способствует длительное, иногда 6—10 мес, пребывание больного в стационаре, тяжёлое течение опухоли, для адекватной терапии которой необходимо проведение инвазивных исследований, наличие сосудистых доступов. Рассматривают и смешанный механизм инфицирования, когда под воздействием антимикробных препаратов ранее чувствительные к антибиотикам эндогенные штаммы бактерий приобретают детерминанты устойчивости, и, попадая в окружающую среду, они способны сохраняться в условиях стационара и распространяться от пациента к пациенту.

Большинство вспышек внутрибольничных инфекций характеризуются распространением ограниченного числа эпидемических клонов, что подтверждает экзогенную передачу эпидемических штаммов. Распространение генетически родственных изолятов характерно, прежде всего, для отделений реанимации и неонатологии [3]. Так, по результатам О. Paniara и соавт. [4] при генотипировании семи неповторяющихся изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных в отделении реанимации в течение одного месяца, была подтверждена циркуляция единственного эпидемического клона. В то же время при анализе генетического родства энтеробактерий с продукцией БЛРС, полученных в процессе более длительного наблюдения, чаще обнаруживали поликлональность изолятов [5, 6]. В университетском госпитале в Мадриде было проведено молекулярно-генетическое исследование клинически значимых изолятов *Escherichia coli* и *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, полученных в течение 12 лет [7]. Авторы отметили генетическое разнообразие энтеробактерий с продукцией БЛРС, что подтверждает наличие нескольких источников, формирующих пул резистентных микроорганизмов в стационаре. Такими источниками могут быть как эпидемические клоны, так и ранее чувствительные эндогенные штаммы бактерий с приобретенными детерминантами устойчивости, которые впоследствии могут передаваться от одного микроорганизма другому с помощью мобильных генетических элементов.

Можно полагать, что преобладание эндогенного или экзогенного варианта инфицирования определяется не только спецификой стационара, но и видом микроорганизмов. Задачей настоящей работы было проведение генотипирования энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных от больных опухолями системы крови, с целью определения какой из механизмов инфицирования (эндогенный или экзогенный) этими микроорганизмами преобладает в гематологии.

Материал и методы

Проспективное исследование было проведено в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России в 2013—2015 гг. За период исследования у всех пациентов с бактериемией, вызванной энтеробактериями, брали мазок со слизистой оболочки прямой кишки в течение 1—3 сут после получения положительной гемокультуры с целью определения колонизации слизистой продуцентами БЛРС.

Детекцию БЛРС у всех энтеробактерий, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, проводили на хромогенной селективной среде CHROMagar™ESBL и далее подтверждали методом «двойных дисков» согласно методическим рекомендациям МУК 4.21890-04 [8]. Для исследования использовали диски с цефалоспорином III поколения — цефтазидимом (30 мкг), цефтриаксоном (30 мкг) (Oxoid, Великобритания) и амоксициллином с клавулановой кислотой (20/10 мкг) (Becton, Dickinson, США). Согласно рекомендациям, продукцию БЛРС выявляли по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином III поколения напротив диска, содержащего клавулановую кислоту. Для внутреннего контроля качества использовали референтные штаммы *E. coli* ATCC®25922 и *K. pneumoniae* ATCC®700603.

Для выделения ДНК использовали суточную культуру исследуемого микроорганизма. Несколько колоний суспендировали в 0,5 мл воды Milli Q, далее суспензию клеток нагревали в течение 5 мин при 95°C, затем центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин и отбирали супернатант.

Наличие генов резистентности групп *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} и *bla*_{CTX-M}, кодирующих наиболее распространённые бета-лактамазы, определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для детекции групп *bla*_{TEM} и *bla*_{CTX-M} использовали наборы реагентов для выявления генов, кодирующих TEM и CTX-M бета-лактамазы («Литех», Россия). Для выявления генов, кодирующих SHV бета-лактамазы, использовали ПЦР-РВ со специфичными праймерами (179-s-F 5'-CGATGAACGCTTTCCCATGA-3'; 280-s-R 5'-AGATCCTGCTGGCGATAGT-3').

Принадлежность CTX-M бета-лактамаз к одному из 5 известных генетических кластеров (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25-родственные ферменты) определяли с помощью специфичных праймеров (табл. 1). Для детекции генов CTX-M бета-лактамаз у каждого изолята было проведено две мультиплексные ПЦР: в первой использовали специфичные праймеры для определения генов групп *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-8} и *bla*_{CTX-M-9}, во второй — *bla*_{CTX-M-2} и *bla*_{CTX-M-25}. ПЦР проводили в конечном объёме 20 мкл, содержащем 6 мкл экстрагированной ДНК, 8 мкл ПЦР-смеси-2-blue (ИнтерЛабСервис, Россия), 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), специфичные праймеры в концентрации 0,1 мкМ (каждый).

Программа амплификации с использованием термоциклера CFX96 Touch (BioRad, США) включала следующие этапы: предварительная денатурация (95°C в течение 3 мин), затем следовали 33 цикла денатурации (95°C в течение 20 с), отжига (58°C в течение 30 с), элонгации (72°C в течение 50 с), затем один цикл при 72°C в течение 4 мин. Полученные продукты ПЦР разделяли в 1% агарозном геле (Helicon, Россия) с добавлением этидия бромид (BioRad, США) при 200В в 1хТАЕ буфере (Литех, Россия). Визуализацию полос проводили при облучении УФ-светом с λ 260 нм при помощи трансиллюминатора (Vilber Lourmat, Франция). В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер GeneRuler™, 100 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США).

Для определения генетического родства изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС был использован один из вариантов ПЦР с произвольными праймерами — ERIC-ПЦР. В работе использовали праймер ERIC1 [9]. В результате разделения в 1% агарозном геле получали набор ПЦР-фрагментов (профиль), характерный для каждого изолята. Сравне-

Таблица 1. Праймеры, используемые для проведения ПЦР

Ген	Название праймера	Последовательность олигонуклеотидов (5'–3')	Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M-1-For CTX-M-1-Rev	TGCCGAATTAGAGCGGCAGTC GCTGTACACCCAATGCTTTACC	504
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M-2-For CTX-M-2-Rev	GAAGCACCTGCTAAATCAGCG GGTTGGTGGTGCCATAATCTC	470
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-M-8-For CTX-M-8-Rev	TCGCGTTAAGCGGATGATGC CCGTCCGGTGACGATTTTCGC	857
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M-9-For CTX-M-9-Rev	GGAAACGCAAAAGCAGCTGCTT AGTTTCGCCAGCGCATGAC	352
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	CTX-M-25-For CTX-M-25-Rev	GTGCCCAGGCGAACGATGTT TCTCTGCCTTCGGCTCCGA	743

Таблица 2. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки при бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС

Гемокультура		Колонизация слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС	
Энтеробактерии	<i>n</i>		
Всего	91		27 (30%)
Из них,			
с продукцией БЛРС	19		19 (100%)*
без продукции БЛРС	72		8 (11%)*

Примечание. * — $p < 0,0001$.

ние и интерпретацию результатов исследования проводили с использованием программы компьютерного анализа (GelJ v.1.3). Анализ ПЦР-профилей с построением дендрограмм был выполнен с использованием коэффициента Dice и алгоритма сравнения невзвешенных попарных средних (UPGMA). Изоляты считали генетически родственными, если коэффициент сходства (КС) был 80% и более.

Результаты исследования

Характеристика микроорганизмов, выделенных из гемокультуры. В исследование были включены 89 случаев бактериемии, вызванной энтеробактериями, у 82 больных в возрасте от 18 до 77 лет (медиана 50 лет). Основную долю составили больные острыми лейкозами (46%, $n=38$) и лимфомами (33%, $n=7$). У 5 пациентов были зарегистрированы неоднократные выделения энтеробактерий из крови с интервалом более одного месяца: три повторных эпизода бактериемии были у двоих больных и два — у троих.

В 89 случаях бактериемии был выделен 91 изолят энтеробактерий, поскольку в двух случаях было сочетание микроорганизмов. В структуре возбудителей доминировали *E.coli* (56%, $n=51$), далее следовали *K.pneumoniae* (26%, $n=23$) и *Enterobacter* spp. (9%, $n=8$). Доля других видов энтеробактерий составила 9%, включая *Klebsiella oxytoca* ($n=2$), *Citrobacter* spp. ($n=2$), *Serratia* spp. ($n=2$), *Morganella morganii* ($n=1$), *Raoultella* spp. ($n=1$), *Salmonella* spp. ($n=1$).

Продукция БЛРС была выявлена у 19 (21%) из 91 энтеробактерий, в их число вошли 11 (22%) изолятов *E.coli* и 8 (35%) *K.pneumoniae*. У других видов энтеробактерий продукция БЛРС не была подтверждена. У каждого из 19 БЛРС-положительных изолятов был определен хотя бы один ген из исследуемых групп генов бета-лактамаз

(*bla*_{TEM} или *bla*_{SHV} или *bla*_{CTX-M}). Одновременно наличие двух генов было у 11 (58%) продуцентов БЛРС и трех генов — у 8 (42%). Бета-лактамазы CTX-M типа преобладали и были определены у 18 (95%) изолятов, TEM — у 17 (89%) и SHV — у 11 (58%). Принадлежность CTX-M бета-лактамаз к генетическому кластеру CTX-M-1 была выявлена у 15 (83%) из 18 изолятов, один изолят (5,5%) принадлежал к кластеру CTX-M-9. В нашем исследовании был получен высокий процент детекции групп генов *bla*_{TEM} и *bla*_{SHV}, однако, метод ПЦР не позволяет дифференцировать бета-лактамазы TEM и SHV типа на ферменты широкого и расширенного спектра.

У всех больных при выделении энтеробактерий из гемокультуры брали мазки со слизистой оболочки прямой кишки. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки идентичными по виду энтеробактериями с продукцией БЛРС была во всех 19 случаях бактериемии, вызванной БЛРС положительными энтеробактериями, и только в 8 (11%) из 72 при выделении из гемокультуры энтеробактерий без продукции БЛРС ($p < 0,0001$) (табл. 2). Не наблюдалось выделения продуцентов БЛРС из гемокультуры, если при исследовании мазков со слизистой оболочки прямой кишки не выявляли подобные бактерии.

Генотипирование энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры. Генотипирование методом ERIC-ПЦР было проведено у 19 энтеробактерий с продукцией БЛРС, в число которых вошли *E.coli* ($n=11$) и *K.pneumoniae* ($n=8$). По результатам генотипирования изоляты *E.coli* были объединены в 5 генетических групп (E1–E5) (рис. 1). Группа E1 включала 6 изолятов, E2 — 2 изолята, а E3, E4 и E5 — по одному

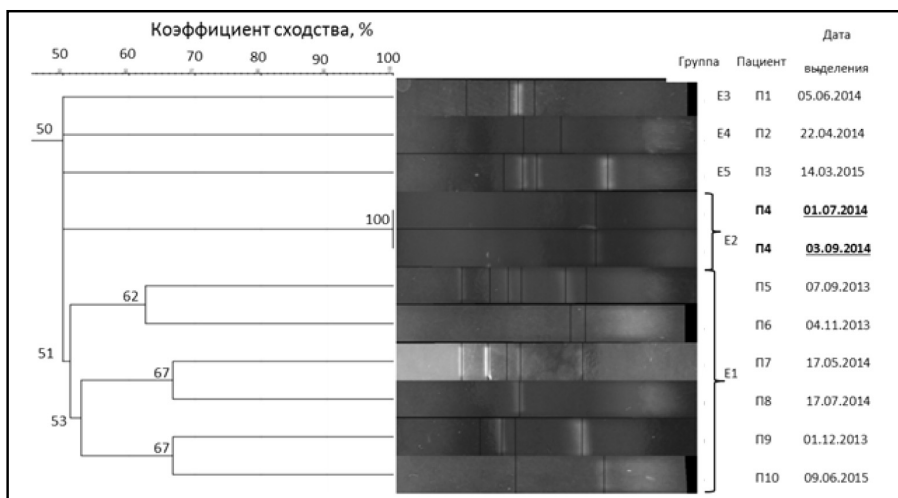


Рис. 1. Дендрограмма генетических профилей *E.coli* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры ($n=11$).

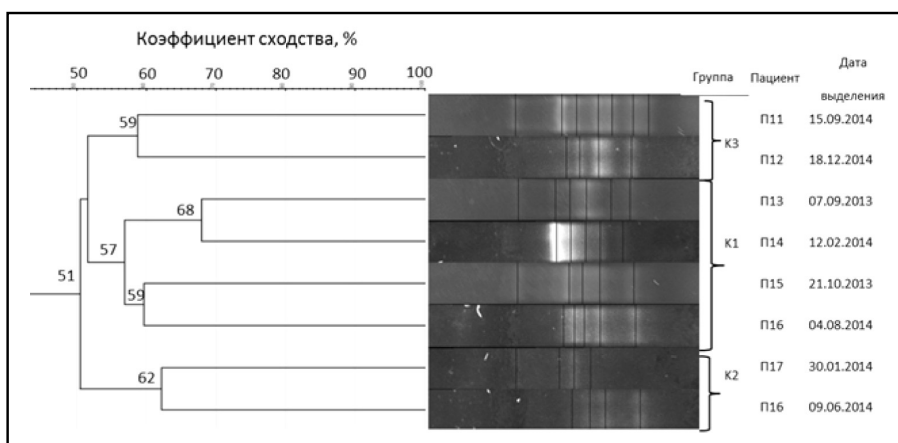


Рис. 2. Дендрограмма генетических профилей *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры ($n=8$).

изоляту (табл. 3). Генетически идентичными (КС=100%) были только два изолята (группа E2), однако оба изолята *E.coli* были выделены из гемокультуры одного пациента (П4) с интервалом в два месяца. В группе E1 КС варьировал от 51 до 67%, и период между выделением изолятов составлял от 2 мес до 1,5 лет. Представители групп E3, E4 и E5 обладали уникальными генетическими профилями с интервалом выделения из гемокультуры больных от 44 дней до 11 мес.

Методом ERIC-ПЦР было проведено попарное генотипирование изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, у одного и того же больного. Всего было проанализировано 22 генетических профиля *E.coli* (11 пар) и 16 генетических профилей *K.pneumoniae* (8 пар) (рис. 3).

Генетически идентичными были три пары изолятов *E.coli* (6 изолятов), среди них две пары *E.coli*

Результаты генотипирования восьми *K.pneumoniae* представлены на рис. 2. При анализе дендрограммы было выявлено, что изоляты принадлежали к трём разным генетическим группам (K1—K3). Группа K1 включала 4 изолята, а K2 и K3 — по два. КС в группах варьировал от 57 до 68% (табл. 2). Наиболее высокий КС (68%) был у двух изолятов с интервалом выделения в 5 мес. Как и при анализе изолятов *E.coli*, у одного больного с интервалом в два месяца из гемокультуры дважды выделяли идентичные по виду *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, но генетического родства между ними не было выявлено (КС=51%). Таким образом, при анализе генетических профилей *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС из гемокультуры было выявлено генетическое разнообразие всех микроорганизмов, включая изоляты от одного больного.

Попарное генотипирование энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки

Таблица 3. Результаты генотипирования энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры

Энтеробактерии с продукцией БЛРС		Генотипирование		
Вид	N	Группа	Количество изолятов, n	КС между изолятами, %
<i>E.coli</i>	11	E1	6	51—7
		E2	2	100
		E3	1	—
		E4	1	—
		E5	1	—
<i>K.pneumoniae</i>	8	K1	4	57—68
		K2	2	62
		K3	2	59

имели полное совпадение (КС=100%), и для одной пары КС составил 92% (рис. 3, а). Среди *K.pneumoniae* было выявлено две пары генетически родственных изолятов с КС 83 и 92%, соответственно (рис. 3, б). Таким образом, в 5 (26%) из 19 случаев бактериемии изоляты из гемокультуры были генетически родственными изолятам, выделенным со слизистой оболочки кишечника, включая 3 (28%) пары *E.coli* и 2 (25%) — *K.pneumoniae* (табл. 4).

Как было представлено ранее, у одного больного дважды с интервалом в два месяца из гемокультуры были выделены генетически идентичные (КС=100%) изоляты *E.coli*. Изоляты, полученные со слизистой прямой кишки (от 01.07.2014 и от 03.09.2014) у этого больного, также оказались генетически родственными (КС=87%) между собой, но не было выявлено генетического родства между изолятами, выделенными из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки.

Также хотелось бы отметить, что генетически родственными (КС=82%) оказались два изолята *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенные из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, от разных пациентов (П15, П12) (рис. 3, б). Из этих изолятов первым был выделен изолят со слизистой оболочки прямой кишки у одного больного, и лишь через год и два месяца был получен генетически родственный изолят из гемокультуры другого больного.

Обсуждение результатов

Одним из основных факторов развития инфекций, вызванных энтеробактериями с продук-

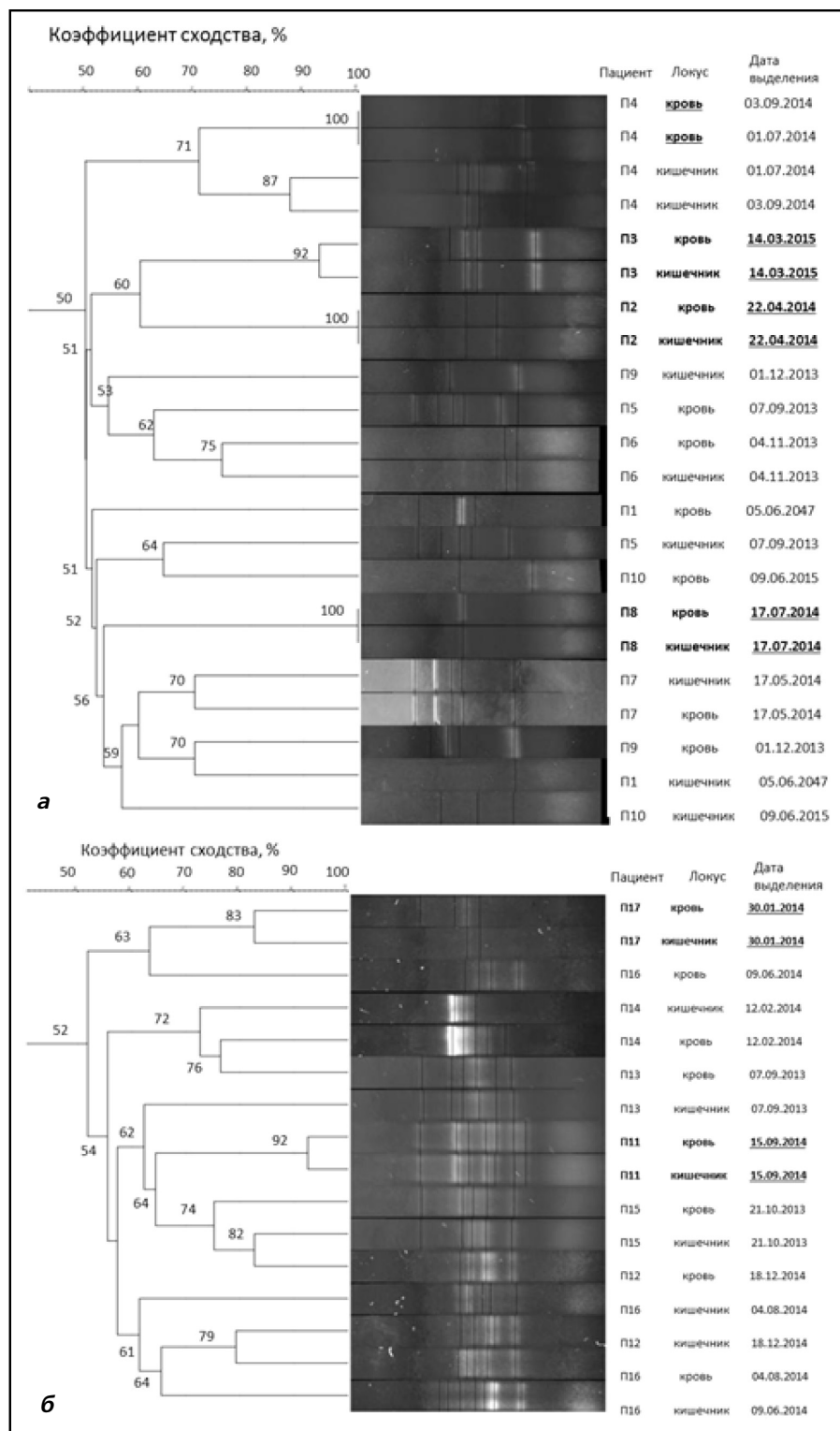


Рис. 3. Дендрограммы генетических профилей *E.coli* ($n=22$, а) и *K.pneumoniae* ($n=16$, б) с продукцией БЛРС из гемокультуры и со слизистой прямой кишки.

цией БЛРС, является предшествующая колонизация слизистой оболочки кишечника этими бактериями. Риск возникновения инфекции, вызванной продуцентами БЛРС, возрастает в 5–18 раз, если определяется детекция БЛРС-положи-

Таблица 4. Результаты попарного генотипирования энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки

Энтеробактерии		КС энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой прямой кишки и из гемокультуры, n (%)		
Вид	Число пар	>80%	60–79%	<60%
<i>E.coli</i>	11	3 (28)	4 (36)	4 (36)
<i>K.pneumoniae</i>	8	2 (25)	3 (37,5)	3 (37,5)
Всего	19	5 (26)	7 (37)	7 (37)

тельных бактерий со слизистой оболочки прямой кишки [10]. По результатам исследования, проведенного в многопрофильном стационаре Тель-Авива (Израиль), колонизация кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС была выявлена у 26 (10,8%) из 241 больного при госпитализации в стационар [11]. Впоследствии бактериемия развилась у 4 (15,4%) из 26 больных, имевших колонизацию энтеробактериями с продукцией БЛРС, и была вызвана тем же видом бактерий, и лишь у 1 (0,5%) из 215 больных без колонизации продуцентами БЛРС. Колонизация слизистой оболочки энтеробактериями с продукцией БЛРС явилась предиктором бактериемии, вызванной этими микроорганизмами (ОШ 38,9; $p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены в исследованиях у гематологических больных. В работе В. J. Liss и соавт. [12], опубликованной в 2012 г., приведены данные о 513 больных гемобластозами и солидными опухолями. Микробиологическое исследование образцов кала проводили в течение 72 ч после госпитализации в стационар, и колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС была выявлена у 90 (17,5%) больных. В дальнейшем бактериемия, вызванная энтеробактериями с продукцией БЛРС, развилась у 6 (6,6%) из 90 больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника БЛРС-продуцирующими бактериями и только у 2 (0,5%) из 423 больных без колонизации (ОШ 4,5). В нашем исследовании были получены аналогичные результаты. Частота бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС, у больных с колонизацией этими микроорганизмами составила 7,5% (5 из 68 случаев), и не было случаев бактериемии, вызванной продуцентами БЛРС, у больных без колонизации этими бактериями (0 из 105 случаев; $p = 0,009$) [13]. Информация о наличии колонизации устойчивыми бактериями позволяет косвенно предположить вероятного возбудителя у больных с персистирующей фебрильной нейтропенией.

Повсеместное распространение резистентности к антимикробным препаратам среди возбудителей инфекционных осложнений у больных гемобластозами способствовало пересмотру «классической» стратегии назначения антимикробных препаратов в гематологии. В международных рекомендациях экспертов ECIL-4 (European Conference on Infections in Leukaemia)

[14], выпущенных в 2013 г., впервые помимо эскалационного подхода была предложена стратегия деэскалации антимикробной терапии в период гранулоцитопении у больных гемобластозами, которая раньше использовалась лишь у тяжёлых больных в ОРИТ. При деэскалационном подходе в качестве препаратов для 1-го этапа рекомендовано применять антибиотики с более широким спектром, включая активность против энтеробактерий с продукцией БЛРС и/или полирезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, такие как карбапенем с антипсевдомонадной активностью или сочетание бета-лактамов антибиотиков с колистином. В дальнейшем можно провести деэскалацию антимикробной терапии в соответствии с результатами микробиологических исследований. Причём, показанием к использованию деэскалационного подхода у больных с фебрильной нейтропенией являются не только септический шок или тяжёлая пневмония, но и колонизация или предшествующая инфекция полирезистентными микроорганизмами. Впервые в гематологии в качестве препаратов для 1-го этапа при деэскалационном подходе было рекомендовано применение карбапенемов в центрах с высокой долей инфекций, вызванных энтеробактериями с продукцией БЛРС (уровень доказательности ВП), или у больных, колонизированных такими микроорганизмами (уровень доказательности ВП). Акцент в рекомендациях на колонизацию слизистой оболочки полирезистентными грамотрицательными бактериями в выборе антибиотика также является доказательством того, что у больных с персистирующей фебрильной нейтропенией преобладает эндогенный вариант инфицирования.

Основными типами БЛРС до конца 1990 годов были TEM и SHV [15, 16]. В настоящее время во всех странах мира, включая Россию, получили широкое распространение энтеробактерии с продукцией СТХ-М-типа БЛРС, наибольшее эпидемическое значение имеют гены группы СТХ-М-1, и основным представителем этой группы является СТХ-М-15 [15, 17]. По нашим данным, большинство энтеробактерий с продукцией БЛРС (83%), выделенных из гемокультуры, были продуцентами СТХ-М-1-типа бета-лактамаз.

Исследователи отмечают значительное генетическое разнообразие энтеробактерий, проду-

цирующих бета-лактамазы СТХ-М-типа [15, 18]. Так, исследователями из Франции были проанализированы 74 штамма энтеробактерий с продукцией БЛРС, из которых у 71,5% были выявлены гены бета-лактамаз СТХ-М-типа [6]. В это исследование были включены изоляты клинически значимые и со слизистой оболочки прямой кишки. Генотипирование методом ERIC-ПЦР показало, что 40 (54%) изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС обладало уникальными профилями, а 34 (46%) были объединены в шесть генетически родственных кластеров. Было выявлено, что в течение трёх лет в этом стационаре наблюдалось как экзогенное распространение эпидемических клонов энтеробактерий, так и эндогенное инфицирование у больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника.

Поликлональность изолятов, выделенных из гемокультуры больных с гематологическими заболеваниями, была подтверждена в исследовании, проведённом в нашем центре в более ранний период (2003—2006 гг.) [19]. Среди изученных грамотрицательных бактерий ($n=152$) доминирующий клон отсутствовал, идентичные бактерии в одном клоне были представлены ограниченным числом изолятов, и было сделано заключение о наличии двух вариантов инфицирования в стационаре — эндогенном и экзогенном, с преобладанием эндогенного. Однако для штаммов *E.coli* наиболее характерным было эндогенное инфицирование, а экзогенный путь передачи инфекции чаще определялся у *P.aeruginosa*, поскольку генетически родственные изоляты определяли достоверно чаще среди изолятов *P.aeruginosa*, чем среди изолятов *E.coli* (35% против 3%, $p<0,001$).

В представленной работе мы проводили генотипирование только энтеробактерий с продукцией БЛРС, и выявили разнообразие генетических профилей изолятов. Подобные результаты были получены другими исследователями при генотипировании энтеробактерий. Так, в исследовании, проведённом в университетском онкологическом центре в Барселоне, при генотипировании *E.coli* с продукцией БЛРС ($n=17$) из гемокультуры также была определена поликлональность, все изучаемые изоляты не были генетически родственными [20].

Число публикаций, в которых оценивается генетическое родство идентичных по виду энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных у одного и того же пациента из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, ограничено. По данным С. Cuartero и соавт. [21], у одного из 12 пациентов с колонизацией *E.coli*, продуцирующими БЛРС, развилась бактериемия, вызванная идентичными по виду бактериями. Исследователями было подтверждено генетическое родство изолятов, полученных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки у этого пациента. Анало-

гичное исследование проводили в университетском медицинском центре в Мериленде [22], в процессе которого были изучены изоляты *Acinetobacter baumannii*, полученные у шести больных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки. По результатам пульс-электрофореза у всех пациентов было подтверждено генетическое родство исследуемых изолятов, полученных из разных локусов.

В наше исследование было включено двое больных с двукратным выделением идентичных по виду продуцентов БЛРС из гемокультуры. У одного больного изоляты *E.coli*, выделенные из гемокультуры с интервалом в два месяца, были генетически родственными, в то время как у другого больного изоляты *K.pneumoniae* имели разные ПЦР-профили (КС=51%). Аналогичные результаты были получены в исследовании A. Samet и соавт. [23]. Неоднократное выделение *E.coli* из гемокультуры было у шести больных гематологическими заболеваниями и только у троих повторные эпизоды бактериемии были вызваны генетически родственными изолятами *E.coli*. В этой работе также было проведено генотипирование изолятов *E.coli*, выделенных в повторных исследованиях из образцов кала, которое показало, что у больных с гемобластозами в течение нескольких недель происходит смена одного генотипа *E.coli* на другой. Авторы исследования объясняют полученные результаты изменчивостью кишечной микрофлоры у больных гемобластозами, возникающей под воздействием ряда факторов, наиболее значимыми из которых являются антибиотики и цитостатические препараты, приводящие к селекции наиболее резистентных изолятов. Следовательно, в кишечнике может находиться одновременно несколько разных штаммов энтеробактерий одного вида. Так, в исследование, проведённое В. Krawczyk и соавт. [24], было включено 115 больных гемобластозами, у каждого пациента был выделен один изолят *E.coli* из гемокультуры и от трёх до десяти фенотипически разных изолятов *E.coli* со слизистой оболочки кишечника. Молекулярно-генетическое исследование доказало, что 77% (89 из 115) изолятов *E.coli* из гемокультуры были генетически родственными изолятам *E.coli*, полученными со слизистой оболочки прямой кишки. Также у всех *E.coli*, включённых в исследование изучали гены вирулентности, кодирующие такие факторы, как Dr-адгезин, F1C-фимбрии и другие. Генетически родственные изоляты из крови и со слизистой оболочки кишечника имели идентичные наборы генов вирулентности. Интересно отметить, что изоляты из гемокультуры достоверно чаще имели гены вирулентности, кодирующие Dr-адгезин, в отличие от штаммов *E.coli*, выделенных со слизистой оболочки кишечника у того же больного, но

не являющихся генетически родственными (16% против 5%, $p=0,009$). И наоборот, гены, кодирующие F1C-фимбрии, значимо чаще определяли у изолятов *E.coli*, которые были получены со слизистой оболочки кишечника, и не являлись генетически родственными изоляту из гемокультуры (36% против 17%, $p=0,001$). Это исследование продемонстрировало, что в кишечнике у больного может постоянно находиться несколько разных штаммов энтеробактерий одного вида, а наличие генов вирулентности у штаммов *E.coli*, колонизирующих слизистую кишечника, может быть дополнительным фактором, предрасполагающим к транслокации энтеробактерий со слизистой оболочки кишечника в кровотоки.

По результатам нашей работы, 26% бактериемий были обусловлены изолятами генетически родственными изолятам энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенным со слизистой прямой кишки. Такое родство является подтверждением эндогенного инфицирования при бактериемии у больных с гемобластомами. В остальных случаях (74%) колонизация и бактериемия у одного и того же пациента были вызваны разными штаммами одного вида. Невысокий процент совпадений (26%) можно объяснить ограничениями нашего исследования, поскольку при генотипировании мы анализировали только один изолят, выделенный со слизистой оболочки кишечника, в то время как на слизистой оболочке кишечника могут находиться одновременно несколько БЛРС-положительных штаммов энтеробактерий одного вида.

При анализе результатов парного генотипирования оказалось, что генетически родствен-

ными были два изолята *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенные из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, но от разных больных. Интервал между выделениями изолятов составил один год и два месяца. Можно предположить, что была длительная циркуляция изолята *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС в окружающей среде стационара с последующей экзогенной передачей пациенту. Такое генетическое родство изолятов возможно при смешанном варианте инфицирования, когда ранее чувствительные к антимикробным препаратам эндогенные микроорганизмы приобретают детерминанты устойчивости под воздействием антибиотиков, и, попадая в окружающую среду стационара, вызывают экзогенное инфицирование других больных.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что у больных опухолями системы крови при бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС, преобладает эндогенный путь инфицирования. Не было выявлено генетического родства между энтеробактериями с продукцией БЛРС, выделенными от разных больных. Доказано, что бактериемия, вызванная БЛРС-положительными бактериями, была только у пациентов с колонизацией слизистой оболочки кишечника идентичными по виду продуцентами БЛРС, а в 26% случаев было подтверждение генетического родства идентичных по виду изолятов, выделенными из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки.

ЛИТЕРАТУРА

- Mikulska M., Viscoli C., Orasch C., Livermore D.M., Averbuch D., Cordonnier C. et al. Aetiology and resistance in bacteraemia among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect* 2014; 68 (4): 321–331.
- Клясова Г.А. Инфекции при гемобластозах и депрессиях кроветворения: клиника, диагностика и лечение: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.: 2009. / *Klyasova G.A. Infekcii pri gemoblastozah i depressijah krovetvorenija: klinika, diagnostika i lechenie: Avtoref. diss. ... d-ra med. nauk. M.: 2009. [in Russian]*
- Guyot K., Biran V., Doit C., Moissenet D., Guillard T., Brasme L. et al. Raman spectroscopic analysis of the clonal and horizontal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 2827–2834.
- Paniara O., Platsouka E., Dimopoulou H., Tzelepi E., Miriagou V., Tzouveleki L.S. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother* 2000; 12 (3): 204–207.
- Giraud-Morin C., Fosse T. A seven-year survey of *Klebsiella pneumoniae* producing TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase in Nice University Hospital (1994–2000). *J Hosp Infect* 2003; 54 (1): 25–31.
- Marcade G., Brisse S., Bialek S., Marcon E., Leflon-Guibout V., Passet V. et al. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. *Epidemiol Infect* 2013; 141 (8): 1705–1712.
- Baquero F., Coque T.M., Cantón R. Allodemics. *Lancet Infect Dis* 2002; 2 (10): 591–592.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.21890-04). *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2004; 6: 306–359.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 (24): 6823–6831.
- Biehl L.M., Schmidt-Hieber M., Liss B., Cornely O.A., Vehreschild M.J. Colonization and infection with extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in high-risk patients - Review of the literature from a clinical perspective. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42 (1): 1–16.
- Ben-Ami R., Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Schwartz D., Giladi M., Chmelnitsky I. et al. Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 42 (7): 925–934.
- Liss B.J., Vehreschild J.J., Cornely O.A., Hallek M., Fätkenheuer G., Wisplinghoff H. et al. Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection* 2012; 40 (6): 613–619.
- Охмат В.А., Клясова Г.А., Коробова А.Г., Паровичникова Е.Н., Федорова А.В., Троицкая В.В. и соавт. Следует ли назначать карбапенемы всем больным с фебрильной нейтропенией и колонизацией энтеробактериями с продукцией β -лактамаз расширенного спектра? Онкогематология 2016;11(3): 49–57. / *Okhmat V.A., Klyasova G.A., Korobova A.G., Parovichnikova E.N., Fedorova A.V., Troickaja V.V. i soavt. Sleduet li naznachat' karbapenemyi vsem bol'nym s febril'noj nejtropeniej i kolonizaciej jenterobakterijami s produkciej β -laktamaz rasshirennogo spektra? Onkogematologija 2016;11(3): 49–57. [in Russian]*
- Averbuch D., Orasch C., Cordonnier C., Livermore D.M., Mikulska M., Viscoli C. et al. European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance: summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. *Haematologica* 2013; 98 (12): 1826–1835.

15. Calbo E., Garau J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol* 2015; 10 (6): 1063–1075.
16. Сидоренко СВ., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биол хим* 2004; 44: 263–306. / *Sidorenko SV., Tishkov V.I. Molekuljarnye osnovy rezistentnosti k antibiotikam. Uspekhi biol khim* 2004; 44: 263–306. [in Russian]
17. Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2005; 7 (4): 323–336. / *Jejdel'shtejn M.V., Strachunskij L.S. Dinamika rasprostranennosti i chuvstvitel'nosti BLRS-producirujushhikh shtammov jenterobakterij k razlichnym antimikrobnym preparatam v ORIT Rosii. Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2005; 7 (4): 323–336. [in Russian]
18. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G. et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59 (2): 165–174.
19. Клясова Г.А., Бриллиантова А.Н., Миронова А.В. Генотипирование грамотрицательных бактерий, выделенных из крови при сепсисе у больных с гематологическими заболеваниями. *Тер архив* 2007; 79 (7): 74–80. / *Klyasova G.A., Brilliantova A.N., Mironova A.V. Genotipirovanie gramotricatel'nykh bakterij, vydelennykh iz krovi pri sepsise u bol'nykh s gematologicheskimi zabojevanijami. Ter arkhiv* 2007; 79 (7): 74–80. [in Russian]
20. Gudiol C., Calatayud L., Garcia-Vidal C., Lora-Tamayo J., Cissal M., Duarte R. et al. Bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65 (2): 333–341.
21. Cuartero C., Sánchez Díaz A.M., Ruiz-Garbajosa P., Valverde A., Alonso J.M., Rodríguez J.D. et al. Dynamics of intestinal colonization with extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in neutropenic oncohaematological patients. P2132 In: *Bacterial infections in cancer patients. Proceeding of 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013 Apr 27-30; Berlin, Germany.* Available from: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?q=Cuartero+C.&id=2173&L=0&x=27&y=18
22. Thom K.A., Hsiao W.W., Harris A.D., Stine O.C., Rasko D.A., Johnson J.K. Patients with *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections are colonized in the gastrointestinal tract with identical strains. *Am J Infect Control* 2010; 38 (9): 751–753.
23. Samet A., Śledzińska A., Krawczyk B., Hellmann A., Nowicki S., Kur J. et al. Leukemia and risk of recurrent *Escherichia coli* bacteremia: genotyping implicates *E.coli* translocation from the colon to the bloodstream. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32 (11): 1393–1400.
24. Krawczyk B., Śledzińska A., Szemiako K., Samet A., Nowicki B., Kur J. Characterisation of *Escherichia coli* isolates from the blood of haematological adult patients with bacteraemia: translocation from gut to blood requires the cooperation of multiple virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34 (6): 1135–1143.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Коробова Анна Геннадьевна — научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ГНЦ МЗ РФ, Москва

Хрульнова Светлана Алексеевна — к. б. н., старший научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, Москва

Охмат Владимир Александрович — к. м. н., научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ

Клясова Галина Александровна — д. м. н., профессор, заведующая научно-клинической лабораторией клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, Москва

Мультицентровое исследование распространённости назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* на отдельных территориях Республики Казахстан до и после начала противопневмококковой вакцинации

Б. А. РАМАЗАНОВА¹, Л. Т. ЕРАЛИЕВА², К. К. МУСТАФИНА¹, Е. А. КОЛОСКОВА^{1*}

¹ Казахский национальный медицинский университет им. С. Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан

² НИИ фундаментальной и прикладной медицины им. Б. Атабарова, Алматы, Республика Казахстан

A Multicenter Study of the Prevalence of Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Selected Areas of the Republic of Kazakhstan Before and After the Onset of Antipneumococcal Vaccination

B. A. RAMAZANOVA¹, L. T. ERALIEVA², K. K. MUSTAFINA¹, E. A. KOLOSKOVA¹

¹ B. Atchabarov Institute of Fundamental and Applied Medicine, Almaty, Republic of Kazakhstan

² Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Republic of Kazakhstan

Введение. Колонизация *S.pneumoniae* рассматривается как фактор распространения пневмококка в популяции и является предиктором развития пневмококковой инфекции. Вакцинация против пневмококковой инфекции способна существенно снизить распространение *S.pneumoniae* и уровень носительства инвазивных штаммов. В Республике Казахстан в рамках национальной программы «Саламатты Казахстан» в 2011 г. проводится вакцинация против пневмококковой инфекции с поэтапным охватом по всей стране. Цель: Охарактеризовать назофарингеальное носительство *S.pneumoniae* у детей до 2 лет в двух разных регионах страны с разной историей иммунизации против пневмококковой инфекции. **Методы.** Проспективное многоцентровое кросс-секционное исследование проводилось в двух городах: в г. Алматы и в г. Караганда в течение двухлетнего периода. Носоглоточные образцы идентифицировали микробиологическим и молекулярно-генетическими методами с учетом вакцинального статуса детей. **Результаты.** За время исследования было обследовано 500 детей из Алматы и 1000 детей из Караганды в возрасте до 2 лет. Распространенность пневмококкового носительства на первом этапе исследования составила 15,6% в Алматы и 4,7% в Караганде. Во второй год исследования распространенность пневмококкового носительства была определена в Алматы — 14,1%, в Караганде — 17,6%. Наиболее распространенные серотипы в Алматы до вакцинации: 13 — 12%, 6ABC — 8%, 15B/C — 8% и 17F — 8%, в Караганде, где вакцинация проводилась в течение 2 лет: 15B — 19%, 31 — 14,3%, 38 — 14,3% и нетипируемые штаммы — 23,8%. На втором этапе исследования распространённые серотипы в Алматы: 15A — 11,1%, 39F — 11,1%, 22F — 8,3%, 31 — 8,3% и нетипируемые штаммы — 27,8%. В Караганде в 2016 году наиболее часто определяемыми серотипами были 8 — 14,3%, 10F/10C/33C — 10,4%, 15B/C — 9,1% и нетипируемые штаммы — 23,4%. **Обсуждение.** Полученные данные показывают необходимость мониторинга на фоне проводимой противопневмококковой вакцинации.

Ключевые слова: пневмококковое бактерионосительство, серотипы, пневмококковая инфекция, *Streptococcus pneumoniae*.

Introduction. Colonization of *S.pneumoniae* is considered as a factor in the spreading of pneumococcus in the population, and is a predictor of the development of pneumococcal infection. Vaccination against pneumococcal infection can significantly reduce the spread of *S.pneumoniae* and the number of carriers of invasive strains. The vaccination against pneumococcal infection in the Republic of Kazakhstan was carried out with a phased coverage throughout the country in the framework of the national program «Salamatty Kazakhstan» in 2011. **Purpose.** To characterize the nasopharyngeal carriage of *S.pneumoniae* in children under 2 years in two different regions of the country with different histories of immunization against pneumococcal infection. **Methods.** A prospective multicenter cross-sectional study was conducted in two cities — Almaty and Karaganda — for a two-year period. Nasopharyngeal samples were identified by microbiological and molecular/genetic methods, taking into account the vaccinal status of children. **Results:** During the study, 500 children from Almaty and 1000 children from Karaganda at the age of 2 years were examined. The prevalence of pneumococcal carriage in the first stage of the study was 15.6% in Almaty and 4.7% in Karaganda. In the second year of the study, the prevalence of pneumococcal carriage was 14.1% in Almaty and 17.6% in Karaganda. The most common serotypes in Almaty before the vaccination were: 13 — 12%, 6ABC — 8%, 15B/C — 8% and 17F — 8%, in Karaganda, where the vaccination was carried out for 2 years: 15V — 19%, 31 — 14, 3%, 38 — 14.3% and non-typed strains — 23.8%. At the second stage of the study, common serotypes in Almaty were: 15A — 11.1%, 39F — 11.1%, 22F — 8.3%, 31 — 8.3% and non-typed strains — 27.8%. The most frequently detected serotypes in Karaganda in 2016 were: 8 — 14.3%, 10F/10C/33C — 10.4%, 15B/C — 9.1% and non-typed strains — 23.4%. **Discussion.** The received data confirms the necessity of the monitoring measures within the framework of the current anti-pneumococcal vaccination.

Keywords: pneumococcal bacteriocarrier, serotypes, pneumococcal infection, *Streptococcus pneumoniae*.

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции:

E-mail: koloskova.e.a@gmail.com

Введение

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) продолжает занимать лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всем мире среди взрослых и детей.

Пневмококк — представитель нормальной микрофлоры, экологической нишей которого является носоглотка человека [1]. Носоглотка играет роль своеобразного перекрёстка, который соединяет нос, уши и нижележащие отделы респираторного тракта. Колонизация пневмококка на слизистых верхних отделов респираторного тракта обуславливает формирование бессимптомного назофарингеального носительства. Носительство же важно рассматривать с позиций эпидемиологического процесса: способствует горизонтальному распространению пневмококка в популяции и рассматривается как начальное звено патогенеза пневмококковой инфекции, которое необходимо для развития инвазивных инфекций [2]. По данным ВОЗ, ежегодно от пневмококковой инфекции погибают 1,6 млн людей, из которых 700 тыс — 1 млн — это дети до 5 лет [3].

В настоящее время выделяют более 90 серотипов *S.pneumoniae*, из которых способностью вызывать инвазивные инфекции обладают около 30 серотипов. Их состав может существенно различаться в разных регионах мира [4, 5]. Контингент, наиболее подверженный формированию пневмококкового бактерионосительства — дети в возрасте до 5 лет. Первая встреча с пневмококком может произойти как в первую неделю жизни, так и в первые 6 мес жизни с последующим формированием назофарингеального носительства [6]. Распространённость назофарингеального носительства у детей до 2 лет достигает 90%, причём уровень носительства выше в странах со средним и низким уровнями дохода [7].

Среди стран СНГ наиболее изучена проблема бактерионосительства в Российской Федерации, где по данным отдельных авторов уровень носительства составляет от 44—46,7% и достигает 92,5% с повышением возраста и началом посещения детских учреждений [8, 9]. Данных о пневмококковом носительстве в других странах СНГ нет.

Впервые изучение циркуляции штаммов *S.pneumoniae* на территории Республики Казахстан, в г. Алматы, проводились в 1985 г. Результаты исследования показали распространённость серогрупп 3, 6, 8, 9 среди людей больных пневмонией [10]. В настоящее время в Казахстане нет официальной регистрации пневмококковой инфекции, за 25-летнюю историю страны не проводились исследования по установлению частоты пневмококкового носительства среди различных групп населения, нет данных о циркулирующих серотипах и не известна роль *S.pneumoniae* в этио-

логии пневмоний, менингитов, бактериемий и острых средних отитов.

С 2011 г. в Республике Казахстан, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, в рамках национальной программы «Саламатты Казахстан» стартовала вакцинация против пневмококковой инфекции с использованием конъюгированной 13-валентной вакцины, с поэтапным введением по всей стране к 2015 г. [11].

Цель исследования — охарактеризовать назофарингеальное носительство *S.pneumoniae* у детей до 2 лет в двух разных регионах страны с разной историей иммунизации против пневмококковой инфекции.

Материал и методы

Дизайн исследования. Проспективное многоцентровое кросс-секционное исследование проводилось в двух городах в течение 2 лет: в Алматы (октябрь 2014 — май 2015 гг. до начала иммунизации и в марте 2016 по май 2016 гг. — спустя год после начала иммунизации) и в Караганде (с января по апрель 2015 г. и в марте по май 2016 г.). Данные регионы были включены в исследование в связи с имеющимся разным вакцинальным статусом против пневмококковой инфекции. На момент первого этапа исследования в г. Алматы вакцинация против пневмококковой инфекции не началась, в г. Караганда вакцинация проводилась в течение 2 лет. Во время второго этапа исследования в г. Алматы с момента начала вакцинации прошло 11 мес, а в г. Караганда — 3 года.

В исследование приняли участие Городская поликлиника №12, Детская поликлиника №3, Городская поликлиника №31 г. Алматы и Городские поликлиники №1—5 г. Караганда.

Этическое одобрение. Исследование было одобрено Локальной этической комиссией КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, протокол №7 от 30 мая 2014 г.

Критерии включения в исследование:

1. Здоровые дети в возрасте до 2 лет, посетившие поликлиники для плановой иммунизации.
2. Письменное согласие родителей или опекунов.
3. Отсутствие в анамнезе приёма антибактериальных препаратов в течение предшествующих 2 мес.
4. Отсутствие вакцинации против пневмококковой инфекции.
5. Отсутствие признаков острого воспалительного заболевания на момент исследования: нет повышения температуры тела и воспалительных изменений в носоглотке.

Критерии исключения из исследования:

1. Здоровые дети старше 2 лет.
2. Отказ родителей или законных представителей детей от участия в исследовании.
3. Приём антибактериальных препаратов менее чем за 2 мес до участия исследования.
4. Положительная история вакцинации против пневмококковой инфекции.
5. Повышенная температура тела и катаральные проявления в носоглотке на момент исследования.

После получения письменного согласия проводили анкетирование и сбор материала для исследования.

Микробиологические исследования. Сбор материала осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ по изучению пневмококкового бактерионосительства [12]. Материалом для исследования явились мазки из носоглотки, которую собирали нейлоновыми тампонами фирмы «Сорап», Италия, и помещали в транспортную среду и доставляли в течение 6 ч в бактериологическую лабораторию кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова

г. Алматы. В г. Караганда образцы доставлялись в РГКП Карагандинский областной центр Санитарно-эпидемиологической экспертизы в течение 48 ч. Все образцы для проведения ПЦР доставлялись в научно-образовательную лабораторию коллективного пользования КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова.

В лаборатории производили посев материала на Columbia agar, «Biomeriux», Франция с добавлением 5% бараньей крови, на один сектор накладывали диск с гентамицином. Инкубацию производили в вакуумных контейнерах с использованием газогенераторных пакетов GenBox «Biomeriux», Франция при температуре 37°C в течение 24 ч. Спустя сутки инкубации изучали морфологию колоний, выросших вокруг диска, пропитанного гентамицином на наличие α -гемолиза и образование блюдцеобразных колоний и/или колоний с вдавленным центром. Фенотипическую идентификацию производили тестами на чувствительность к оптохину (Biomeriux, Франция) и лизису в присутствии желчных кислот (диски с желчью НИЦФ, Россия).

Чувствительность к оптохину оценивали по задержке роста вокруг диска. При наличии зоны задержки роста более 14 мм, культура считалась оптохиночувствительной. Если зона задержки роста была менее 14 мм, культура интерпретировалась как оптохинорезистентная.

Для определения лизиса солями желчных кислот использовали смоченный дистиллированной водой диск с желчью. Посев инкубировали в термостате 2 ч. Положительным тест расценивался при наличии прозрачной зоны вокруг диска (или зоны лизиса культуры) в размере 1—2 мм.

При положительных тестах фенотипической идентификации сохраняли штаммы в криопробирках при температуре -70°C для дальнейшего изучения молекулярно-генетическим методом ПЦР и проведения молекулярного типирования.

Идентификация других микроорганизмов проводилась на основе морфологии, культуральных и биохимических свойств, характерных для этих видов.

Молекулярно-генетические методы исследования. *Выделение ДНК.* Для выделения ДНК *S.pneumoniae* использовали исходный материал и чистые культуры в криопробирках. В качестве гена-мишени при проведении ПЦР использовали ген *cpsA*.

Перед проведением экстракции лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 прогревали при температуре 65°C до полного растворения кристаллов. Следующим этапом в пробирках, содержащих физиологический раствор, готовили взвесь бактериальных клеток. Отрицательным контролем считали пустую пробирку. В чистые пробирки добавляли 300 мкл лизирующего раствора и вносили 100 мкл бактериальной взвеси. Пробирки тщательно перемешивали в вортексе и прогревали в термостате при температуре 65°C в течение 5 мин.

После центрифугирования 10000 об/мин в течение 30 с, универсальный сорбент ресуспендировали и добавляли в каждую пробирку с последующим перемешиванием на вортексе с паузой в 5 мин. Универсальный сорбент осаждали центрифугированием и аккуратно надосадочную жидкость в количестве 420 мкл удаляли, не затрагивая сорбент. В пробы добавляли 300 мкл раствора 1 для отмывки с перемешиванием на вортексе до полного ресуспендирования универсального сорбента. Снова ресуспендировали универсальный сорбент и отсасывали надосадочную жидкость в количестве 320 мкл. Затем добавляли раствор для отмывки 2 в количестве 1000 мкл с учётом повышенной текучести и перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования. Снова осаждали универсальный сорбент центрифугированием в течение 1 мин и удаляли надосадочную жидкость в объёме 1000 мкл. Далее инкубировали пробирки с открытыми крышками в термостате в течение 10 мин при температуре 65°C для подсушивания сорбента. После инкубации пробирки перемешали в штатив и добавляли 90 мкл ДНК буфера с последующим перемешиванием на вортексе. Потом помещали в термостат на 5 мин при температуре 65°C, периодически встряхивая на вортексе. Следующим этапом проводили центрифугирование проб на максимальных оборотах в течение

1—2 мин, с отсасыванием надосадочной жидкости, содержащей очищенную ДНК, и переносом в отдельную пробирку. Пробы хранили при -70°C перед проведением исследования.

Проведение ПЦР-исследования. ПЦР проводили с использованием набора «АмплиСенс PCR» (ИнтерЛабСервис, Россия) по методике. Pai, R. et al.(2006) (13). Заранее готовили 40 реакционных смесей, соответствующих используемым праймерам. Приготовленные реакционные смеси использовали в течение месяца, а смеси мультиплексов готовили непосредственно перед постановкой ПЦР. ПЦР-смесь 1 или приготовленные мультиплексы в количестве 5 мкл раскапывали на дно пробирки, затем добавляли расплавленный воск (12—17 мкл). На поверхность застывшего воска добавляли 10 мкл ПЦР-смеси 2 — red, с красителем крезоловым красным, не допуская смешивание ПЦР-смеси 1 и ПЦР-смеси 2, потом добавляли каплю минерального масла (10—15 мкл) и 10 мкл выделенной ДНК. Если на стенках пробирок оставались капли реакционных смесей, минерального масла, ДНК, их слегка прокручивали в центрифуге 1 с. После описанных процедур пробы были готовы к проведению амплификации.

Протокол термоциклирования. T=94°C — 2 мин, T=94°C — 10 с, T=52°C — 15 с, T=72°C — 10 с, T=72°C — 2 мин, T=4°C — хранение образцов ДНК.

Количество циклов амплификации зависело от вида биоматериала, откуда была выделена ДНК. Для чистых культур составляла 32 цикла, для исходного материала — 45.

ПЦР-типирование *S.pneumoniae*. ПЦР — серотипирование проводилось поочередно, пока не выявлялся положительный результат. На первом этапе обязательным являлось постановка отрицательного контроля с *cpsA* — праймерами, который служил и «внутренним контролем». Сначала проводили реакции с наиболее часто встречающимися серотипами, с последующим группированием по степени убывания частоты встречаемости серотипов/серогрупп.

Электрофорез. Электрофорез проводили в 2% агарозном геле, погружая в фосфатно-буферный раствор в течение 30 мин под напряжением 30 Вт. Гель промывали в растворе с бромидистым этидием в течение 20 мин. В ультрафиолетовой камере проводили учёт результатов.

Статистический анализ. Подсчёт статистических показателей произведён в программе IBM SPSS 20.0 (отношения шансов по Мантелло—Хенцелю). Доверительный интервал составил 95%.

Результаты исследования

Работы по исследованию пневмококкового назофарингеального носительства проводилось в период с 2014 по 2016 гг. В городе Алматы первый этап исследования начался в октябре 2014 г. и закончился в мае 2015 г. В Караганде исследование началось в январе 2015 г. и завершилось в апреле 2015 г. За указанный период в Алматы было обследовано 250 детей, в Караганде 500 детей. В Караганде 74 ребенка были исключены из исследования как несоответствующие по возрастному критерию.

Второй этап исследования в городах прошел в одинаковый временной период: с марта по июнь 2016 г. В этот период было исследовано 251 ребенок в Алматы и 500 детей в Караганде. В последние 10 детей из г. Алматы и 67 детей из Караганды, которым было >2 лет, были исключены из исследования как несоответствующие критериям включения (возраст старше 2 лет).

Возраст и гендерные особенности обследуемых детей. Средний возраст обследуемых детей в го-

Таблица 1. Распределение обследованных детей по возрастным группам в зависимости от года исследования и региона исследования

Возрастные группы	Алматы				Караганда			
	2014—2015 гг.		2016 г.		2015 г.		2016 г.	
	n	%	n	%	n	%	n	%
До 2 мес	27	61,4	17	38,6	181	59,7	122	40,3
От 2 до 12 мес	158	58,7	111	41,3	73	39,0	114	61,0
От 12 мес до 24 мес	65	36,5	113	63,5	172	46,6	197	53,4

Таблица 2. Микроорганизмы, выделенные бактериологическим методом из носоглотки здоровых детей до 2 лет (г. Алматы)

Микроорганизм	2014—2015 гг.		2016 г.	
	n	%	n	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	43	17,2	41	17,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	12,4	64	26,6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	27	10,8	4	1,7
<i>Streptococcus viridans</i>	18	7,2	14	5,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	1	0,4
<i>Corynebacterium</i> spp.	0	0	14	5,8
Отсутствие роста	130	52,0	101	41,9
Комбинация <i>S.viridans</i> + <i>S.epidermidis</i>	0	0	1	0,4
Комбинация <i>S.aureus</i> + <i>S.pneumoniae</i>	1	0,4	1	0,4

роде Алматы (2014—2015 гг.) составил 8,48; 95% ДИ — 7,712—9,24 мес, в городе Караганда (2015 г.) — 9,03; 95% ДИ — 8,25—9,81. В 2016 г. возраст обследуемых детей в городе Алматы равен 12,17; 95% ДИ — 11,27—13,07 мес и в городе Караганда — 10,38; 95% ДИ — 9,64—11,13.

Распределение по возрастным группам представлено в табл. 1.

В первый год исследования распределение по полу составило: мальчики — 49,2% ($n=123$), девочки 50,8% ($n=127$) в городе Алматы, и в Караганде мальчиков — 47,4% ($n=202$), девочек — 52,6% ($n=224$).

Во второй год исследования распределение по полу в Алматы: мальчики — 49,8% ($n=120$) и девочки — 50,2% ($n=121$), в Караганде: мальчики — 48,0% ($n=208$) и девочки — 52,0% ($n=225$).

История вакцинации против пневмококковой инфекции. В 2015 г. в Караганде из 426 исследуемых 168 (39,44%) детей имели положительную вакцинальную историю против пневмококковой инфекции. Полный курс вакцинации получили 92,9% ($n=156$), неполный курс одной дозой — 4,2% ($n=7$), двумя дозами — 2,9% ($n=5$).

В 2016 г. в Караганде из 433 исследуемых детей, у 198 (45,7%) отмечен положительный статус вакцинации. Из них 97,0% ($n=192$) завершили вакцинацию полным курсом, 1,5% ($n=3$) — иммунизированы только одной дозой, 1,5% ($n=3$) получили 2 дозы вакцины.

В Алматы, во второй этап исследования вошли дети с отрицательной историей вакцинации против пневмококковой инфекции.

Микробный пейзаж носоглотки. Для описания микробного пейзажа носоглотки использовали результаты посевов, полученных от детей, про-

живающих в г. Алматы и изначально не вакцинированных (табл. 2).

Во время первого этапа исследования в г. Алматы бактериологически были выделены четыре микроорганизма: *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pneumoniae*, *S.viridans*, но большую часть составили культуронегативные образцы. Комбинация *S.aureus* и *S.pneumoniae*, выделенная микробиологическим путём, отмечена в одном случае.

Идентификация микроорганизмов методом ПЦР, с прицельным поиском *S.pneumoniae* выявила 100% подтверждение верификации выделенных культур как *S.pneumoniae*, и в двух случаях сочетание бактериологически выделенного *S.aureus* и ПЦР-идентифицированного *S.pneumoniae*.

Во второй этап исследования микробиота носоглотки была представлена разнообразными группами микроорганизмов. Были обнаружены и идентифицированы: *S.epidermidis* — в 26,6% ($n=64$), *S.aureus* — в 17,0% ($n=41$), *S.viridans* — 5,0% ($n=14$), *S.pneumoniae* — 1,7% ($n=4$), *Klebsiella oxytoca* — 0,4% ($n=1$) и комбинация *S.aureus* и *S.pneumoniae* — 0,4% ($n=1$).

Культуронегативные образцы материала составили 41,9% ($n=101$) всех образцов.

Последующее изучение исходного материала методом ПЦР идентифицировало 13 образцов культура-отрицательного материала как *S.pneumoniae* — положительные образцы.

Сочетание культурально выделенного *S.aureus* и *S.pneumoniae*, определенного методом ПЦР, составило 1,7% ($n=4$). Из образцов, содержащих *S.epidermidis*, в 7 был обнаружен *S.pneumoniae*. В образцах с неспецифической микрофлорой 1,7% ($n=4$) идентифицирован *S.pneumoniae* методом ПЦР.

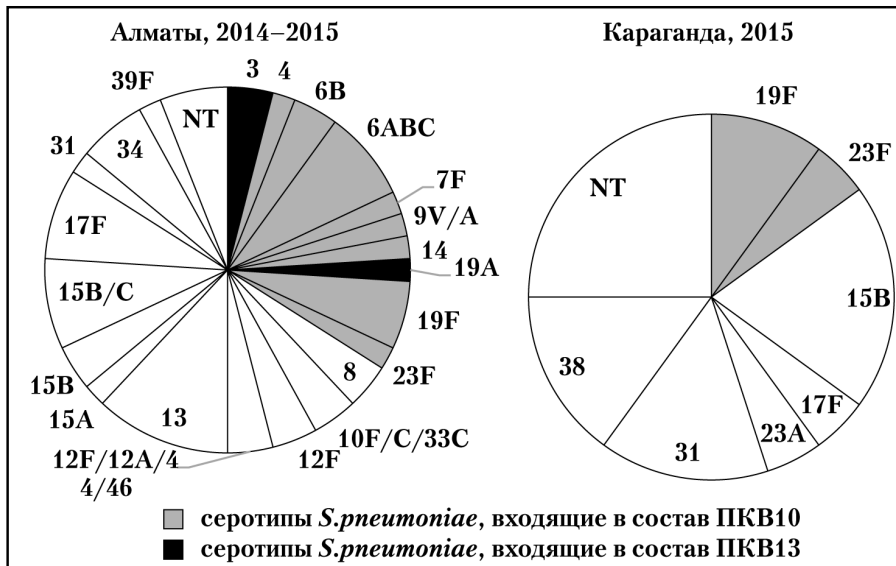


Рис. 1. Дендрограмма генетических профилей *E.coli* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры ($n=11$).

Штаммы *S.pneumoniae*, выделенные бактериологическим методом, подтверждены методом ПЦР.

На первом этапе исследования в Караганде было выделено бактериологическим методом 6 штаммов *S.pneumoniae*, тогда как методом ПЦР было идентифицировано 20 образцов, в том числе 6 культур *S.pneumoniae*.

В течение второго этапа исследования в Караганде было выделено культуральным методом 3 штамма *S.pneumoniae*, а методом ПЦР было идентифицировано 73 культуро-негативных образцов клинического материала и 3 штамма, выделенных бактериологическим методом.

Распространённость назофарингеального носительства *S.pneumoniae* у детей до 2 лет. В городе Алматы до введения вакцинации частота носительства составила 15,6% (39/250), тогда как в Караганде, где на момент проведения исследования вакцинация проводилась уже в течение 2 лет, частота носительства равнялась 4,7% (20/426).

Частота носительства в 2016 г. в городе Алматы, как в городе с проводимой вакцинацией в течение 10 мес, составила 14,1% (34/241), тогда как в Караганде — 17,6% (76/433).

Соотношение шансов и рисков приобретения назофарингеального носительства *S.pneumoniae* для региона с проводимой вакцинацией против пневмококковой инфекции. Был проведён анализ общего отношения шансов (OR) по Мантелю—Хенцелю назофарингеального носительства *S.pneumoniae* у вакцинированных и невакцинированных детей. Для расчёта взяли общее число детей в Караганде, обследованных в течение 2 лет в — 859 детей, из которых вакцинированы 366 детей. Результат составил 1,859; 95% ДИ — 1,221–2,852, указываю-

щий на значительный, статистически достоверный шанс приобретения носительства среди невакцинированных детей.

Оценка риска приобретения пневмококкового назофарингеального носительства в группе невакцинированных детей составила 1,351; 95% ДИ — 1,069–1,708.

В группе вакцинированных детей оценка рисков отсутствия носительства равен 1,073; 95% ДИ — 1,020–1,129.

Серотиповой пейзаж циркулирующих штаммов *S.pneumoniae* на территории регионов с разным статусом вакцинации про-

тив пневмококковой инфекции в 2014–2015 гг. Принимая во внимание отсутствие данных в Республике Казахстан по оценке циркулирующих серотипов *S.pneumoniae* до введения вакцинации, особый интерес вызывает изучение серотипового пейзажа в г. Алматы до введения вакцинации.

Результаты определения серотипов *S.pneumoniae* представлены на рис. 1.

Благодаря использованию метода мультиплекс-ПЦР для серотипирования штаммов *S.pneumoniae*, удалось установить мультиносительство штаммов у 8 (20,5%) детей, из которых у 5 (12,8%) была выделена комбинация двух серотипов. Возраст детей с мультиносительством серотипов 3 и 13, 4 и 12F составил 3 и 6 мес. Сочетания серотипов 8 и 15A, 15B/C и 31 были идентифицированы у детей в возрасте 23 и 24 мес. У ребенка 10 мес определены серотипы 13 и 19F.

У трёх детей (7,7%) была выделена комбинация трёх серотипов: 13, 15B и 17F, 10F/10C/33C, 12F/12A/44/46 и 17F, 15B/C, 19F и 23F. Возраст детей с носительством трёх серотипов составил 3, 8 и 21 мес.

В Караганде мультиносительство было установлено только у одного ребёнка 19 мес и представлено серотипами 15B и 38.

Серотиповой пейзаж циркулирующих штаммов *Streptococcus pneumoniae* на территории регионов с разным статусом вакцинации против пневмококковой инфекции в 2016 г. Исследование циркулирующих серотипов в Алматы спустя 10 мес после начала вакцинации против пневмококковой инфекции показывает изменение композиции циркулирующих штаммов всех серотипов за счёт увеличения количества невакцинных серотипов

и нетипируемых штаммов. Количество идентифицированных серотипов *S.pneumoniae* — 12.

Результаты определения серотипов *S.pneumoniae* представлены на рис. 2.

Мультиносительство установлено у четырёх детей (11,8%), с сочетанием серотипов 15А и 39F, 15А и 31, 15А и 15В, 6В и 19F у детей в возрасте до 1 года (дети 7, 8, 10 и 11 мес жизни).

Картина циркулирующих штаммов в Караганде представлена преимущественно серотипами, не входящими в состав ПКВ (70,1%) и нетипируемыми штаммами (23,4%). Одновременное носительство двух серотипов 6В и 19F было определено в 1,3% случаев ($n=1$). Возраст ребенка составил 4 мес.

Обсуждение результатов

Нами было проведено первое исследование по установлению частоты пневмококкового носительства среди невакцинированных и вакцинированных детей в возрасте до 2 лет в Казахстане. В данном исследовании мы хотели показать уровень носительства пневмококка и различия в серотиповом пейзаже в регионах до начала вакцинации и разной длительностью проводимой вакцинации против пневмококковой инфекции. К сожалению, в Караганде не проводилось исследование распространённости пневмококкового носительства до начала противопневмококковой вакцинации.

Первый этап нашего исследования, проводимый в 2014—2015 гг., показал разный уровень носительства *S.pneumoniae* в Алматы до вакцинации и в Караганде с двухлетней историей вакцинации против пневмококковой инфекции. Распространённость пневмококкового носительства в Алматы и Караганде составила 15,6 и 4,7%.

Мы предполагаем, что на уровень носительства повлияло введение поэтапной вакцинации против пневмококковой инфекции с 2010 г. По данным агентства исследований SANGE, на 2011 год г. Алматы и Карагандинская область стали регионами с наиболее высоким и высоким уровнями миграционной подвижности населения, и перемещение внутренних мигрантов из регионов, где вакцинация уже проводится, по нашему мнению, способствовало стиранию картины истинной распространённости пневмококкового носи-

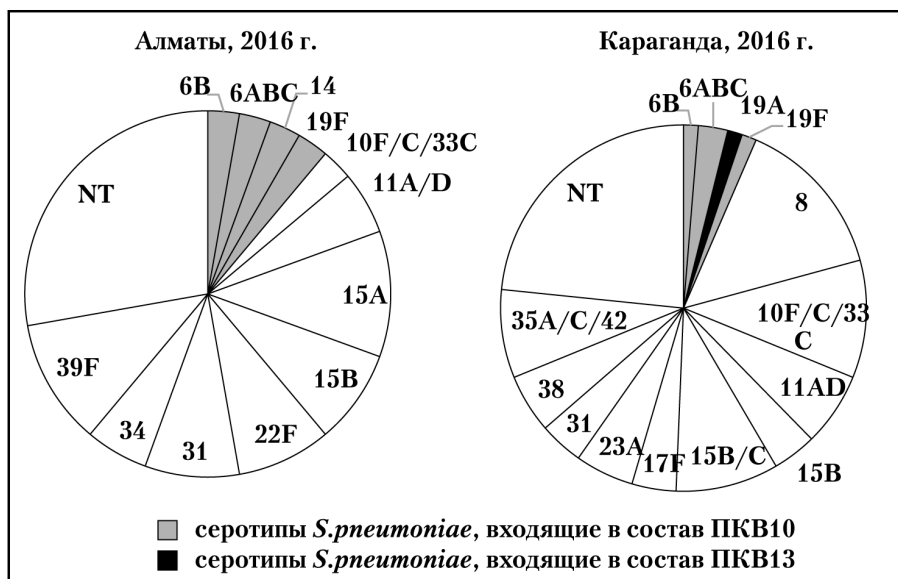


Рис. 2. Дендрограмма генетических профилей *S.pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры ($n=8$).

тельства и циркуляции вакцинных серотипов [14]. Показатель назофарингеального носительства в данных регионах значительно ниже французских и голландских данных, полученных после широкого применения ПКВ7 и замены ПКВ7 на ПКВ13 [15, 16]. Уровень пневмококкового носительства в РФ, которая территориально граничит с Казахстаном значительно выше, и был определен на уровне 44—46,7% среди детей в возрасте до 5 лет открытых и закрытых коллективов [8]. Совместные данные о частоте носительства в Украине и Белоруссии получены от детей до 5 лет из детских домов, и частота пневмококкового носительства составила 75,2% [17]. Данные по частоте носительства и серотипового пейзажа в других странах СНГ отсутствуют.

Казахстан географически расположен в Средней Азии и территориально граничит с Китаем, поэтому мы посчитали целесообразным провести сравнение пневмококкового носительства со странами Юго-Восточной Азии до и после введения вакцинации против пневмококковой инфекции. По данным мультинационального исследования ANSORP уровень носительства среди стран Юго-Восточной Азии существенно различается между собой, достигая максимума в Индии — 43,2% и минимального уровня в Сингапуре — 9,0%. В Китае уровень носительства составил 37,5% [18]. Эти данные получены у детей младше 5 лет и они ниже показателей европейских стран и США.

Данные второго этапа исследования показали, что в Алматы, где вакцинация проводилась в течение 10 мес, частота пневмококкового носительства составила 14,1%, и в Караганде — 17,6%. Учитывая, что это исследование — кросс-секци-

онное, то изменения в частоте носительства за 2 года мы на данном этапе оценить не можем.

Стоит отметить, что во время первого этапа исследования в Казахстане была приостановлена вакцинация от пневмококковой инфекции в течение 6 мес. Мы предполагаем, что сформировавшийся популяционный эффект проводимой вакцинации в Караганде повлиял на уровень носительства и серотиповой пейзаж циркулирующих в этом регионе серотипов, следовательно, прекращение вакцинации в течение длительного срока привело к увеличению числа детей-носителей *S.pneumoniae* в Караганде во втором этапе исследования.

Серотиповой пейзаж в Казахстане отличается от данных других стран, полученных до введения вакцинации. Мы выявили разнообразие циркулирующих штаммов, с распространённостью 6ABC, 13, 15B/C, 17F и 19F в Алматы до введения вакцинации и 15B, 31, 38 в Караганде спустя 2 года проводимой вакцинации, тогда как в зарубежных публикациях имеются данные о преобладающей циркуляции серотипов 6A, 6B, 19A, 19F, 23F в странах с разным уровнем дохода [19].

Мы отмечаем, что в 2014–2015 гг. штаммы *S.pneumoniae* удалось серотипировать в 94% и 76,2% случаев в Алматы и Караганде, соответственно, тогда как в 2016 г. процент типизируемых штаммов стал ниже — 72,2% в Алматы и 76,2% в Караганде. Эти данные совпадают с данными южнокорейских исследователей, которые обнаружили распространённость нетипизируемых серотипов до 30,6% среди вакцинированных и 22,2% невакцинированных детей [20].

Увеличение частоты нетипизируемых штаммов *S.pneumoniae* мы связываем с применением метода мультиплекс-ПЦР, который обладает высокой чувствительностью и специфичностью, но способен идентифицировать всего 22 серотипа и 17 «серогрупп», тогда как в настоящее время известно 97 серотипов [13, 21]. Применение противопневмококковой вакцинации ассоциировано с развитием феномена «замены серотипов», чем

мы объясняем увеличение пропорции нетипизируемых штаммов.

В нашем исследовании отмечается, что до введения вакцинации в Алматы 69,2% штаммов *S.pneumoniae* были выделены бактериологическим путем, в 2016 г. только 11,8% штаммов *S.pneumoniae* были выделены классическими микробиологическими методами, и отмечается 100% подтверждение бактериологического метода методом ПЦР. Мы объясняем низкий процент выделения наличием в циркуляции *S.aureus*, который является антагонистом *S.pneumoniae*, что подтверждает идентификация *S.pneumoniae* методом ПЦР, а также наличие культуральных свойств, относящихся *S.pneumoniae* к «прихотливым» микроорганизмам.

Изменение пропорций циркулирующих штаммов возможно связано с тем, что была введена вакцинация против пневмококковой инфекции, но не исключается воздействие других факторов: вирусные инфекции, приём антибактериальных препаратов, что в нашем исследовании не фиксировалось, и, следовательно, не учитывалось при анализе результатов.

Таким образом, исходя из полученных результатов и опираясь на данные литературы, считаем, что микробиологический мониторинг необходим для оценки динамики изменения назофарингеального носительства и серотипового пейзажа в регионе с проводимой вакцинацией для последующей разработки мер профилактики пневмококковой инфекции.

Источник финансирования: грант ООО «Вакцинология»

Благодарности. Мы благодарим сотрудников поликлиник №12 и №3 г. Алматы Позднову Светлану Юрьевну и Нурсаитову Рабиям Амардиновну, Сейсенбаеву Айгуль Наухановну за отбор детей и сбор образцов для исследования.

Особую благодарность выражаем лаборанту кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова Тисловой Ольге Егоровне за проведение микробиологической идентификации *S.pneumoniae*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tuomanen E.I., Mitchell T.J., Morrison D., Spratt B.G. The Pneumococcus: American Society of Microbiology; 2004.
2. Simell B., Auranen K., Käyhty H., Goldblatt D., Dagan R., O'Brien K.L. et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. Expert Review of Vaccines. 2012; 11 (7): 841–855.
3. WHO Pneumococcal disease [updated 2016/04/10/14:43:20]. Available from: http://www.who.int/immunization/topics/pneumococcal_disease/en/.
4. Hava D.L., LeMieux J., Andrew C. From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. Molecular Microbiology 50 (4): 1103–1110.
5. Hausdorff W.P., Feikin D.R., Klugman K.P. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. Lancet Infect Dis. 2005; 5 (2): 83–93.
6. Käyhty H., Auranen K., Nohynek H., Dagan R., Makela H. Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. Expert Rev Vaccines. 2006; 5 (5): 651–667.
7. Hill P.C., Cheung Y.B., Akisanya A., Sankareh K., Lahai G., Greenwood B.M. et al. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian Infants: A Longitudinal Study. Clin Infect Dis 2008; 46 (6): 807–814.
8. Холодок Г.Н., Морозова Н.В., Алексеева И.Н., Стуkun Е.А., Краковская А.В., Морозова О.И. et al. Частота выявления и характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от носителей и больных у детей в Хабаровском крае. Журн микробиол эпидемиол иммунобиол 2010; 4: 92–97. / Holodok G.N., Morozova N.V., Alekseeva I.N., Stukun E.A., Krakovskaja A.V., Morozova O.I. et al. Chastota vyjavlenija i harakteristika shtammov *Streptococcus pneumoniae*, vydelennyh ot nositelej i bol'nyh u detej v Habarovskom krae. Zhurn mikrobiol jepidemiol immunobiol 2010; 4: 92–97. [in Russian]
9. Козлов Р.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей до 5 лет от отдельных регионов Российской Федерации. Клин микробиол антимикроб тер 13 (2): 177–187. / Kozlov R.S., Chagarjan A.N., Kozlova L.V., Murav'ev A.A. Serologicheskaja harakteristika i chuvstvitel'nost' k antibiotikam pnevmokokkov, vydelennyh u detej do 5 let ot otdel'nyh regionah

- Rossiiskoj Federacii. Klin mikrobiol antimikrob ter 13 (2): 177—187. [in Russian]
10. Костюкова Н.Н., Сахарова А.Е., Баймуратова М.А., Лукасян Л.А. Типирование пневмококков в реакции коаггуляции. Лаб дело 1988; 9: 60—62. / Kostjukova N.N., Saharova A.E., Bajmuratova M.A., Gukasjan L.A. Tipirovanie pnevmokokkov v reakcii koaggljutinacii. Lab delo 1988; 9: 60—62. [in Russian]
 11. Национальная программа «Саламатты Казахстан» на 2011—2015 гг. Available from: <https://strategy2050.kz/ru/page/gosprog1/>. / Nacional'naja programma «Salamatty Kazahstan» na 2011—2015 gg. Available from: <https://strategy2050.kz/ru/page/gosprog1/>. [in Russian]
 12. Satzke C., Turner P., Virolainen-Julkunen A., Adrian P.V., Antonio M., Hare K.M. et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: Updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. Vaccine 2013; 32 (1): 165—179.
 13. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. J Clin Microbiol 2006; 44 (1): 124—131.
 14. Агентство исследований SANGE. Анализ миграционной подвижности населения Республики Казахстан по итогам национальной переписи населения 2009 года. Агентство республики Казахстан по статистике, editor. stat.gov.kz 2011. / Agenstvo issledovanij SANGE. Analiz migracionnoj podvizhnosti naselenija Respubliki Kazahstan po itogam nacional'noj perepisi naselenija 2009 goda. Agenstvo respubliki Kazahstan po statistike, editor. stat.gov.kz 2011. [in Russian]
 15. Bosch A.A., van Houten M.A., Bruin J.P., Wijmenga-Monsuur A.J., Trzcinski K., Bogaert D. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria in the 7th year after implementation of the pneumococcal conjugate vaccine in the Netherlands. Vaccine 2016; 34 (4): 531—539.
 16. Cohen R., Levy C., Bingen E., Bechet S., Derckx V., Werner A. et al. Nasopharyngeal carriage of children 6 to 60 months during the implementation of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. Arch Pediatr 2012; 19 (10): 1132—1139.
 17. Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Братусь Е.В., Перцева Т.А., Карпов И.А., Качанко Е.Ф. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам серотипов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в различных регионах Беларуси и Украины, выделенных. Клинический микробиол. 2013; 15 (2): 147—158. / Murav'ev A.A., Chagarjan A.N., Bratus' E.V., Perceva T.A., Karpov I.A., Kachanko E.F. Serologicheskaja harakteristika i chuvstvitel'nost' k antibiotikam serotipov *Streptococcus pneumoniae*, cirkulirujushchih v razlichnyh regionah Belarusi i Ukrainy, vydelenykh. Klin mikrobiol antimikrob ter 2013; 15 (2): 147—158. [in Russian]
 18. Lee N.Y., Song J.H., Kim S., Peck K.R., Ahn K.M., Lee S.I. et al. Carriage of antibiotic-resistant pneumococci among Asian children: a multinational surveillance by the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). Clin Infect Dis 2001; 32 (10): 1463—1469.
 19. Adegbola R.A., DeAntonio R., Hill P.C., Roca A., Usuf E., Hoet B. et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE 2014; 9 (8): e103293.
 20. Kim K.H., Hong J.Y., Lee H., Kwak G.Y., Nam C.H., Lee S.Y. et al. Nasopharyngeal pneumococcal carriage of children attending day care centers in Korea: comparison between children immunized with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and non-immunized. J Korean Med Sci 2011; 26 (2): 184—190.
 21. Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C. et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. Clin Microbiol Rev 2015; 28 (3): 871—899.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рамазанова Бахыт Амануловна — д. м. н., профессор, проректор по научной работе и инновациям КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан

Ералиева Ляззат Тасбулатовна — д. м. н., директор НИИ ФПМ им. Б. Атчабарова, Алматы, Республика Казахстан

Мустафина Камиля Камаловна — к. м. н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Алматы, Республика Казахстан

Колоскова Екатерина Александровна — PhD докторант 3-го года обучения кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Алматы, Республика Казахстан

Оценка клинической эффективности циклоферона при гепатите В и С у детей и взрослых по результатам систематического обзора и метаанализа

Н. К. МАЗИНА¹, П. В. МАЗИН¹, А. А. ИППОЛИТОВА², А. Л. КОВАЛЕНКО³

¹ Кировский государственный медицинский университет, Киров

² Санкт-Петербургский институт усовершенствования врачей-экспертов Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации, Санкт-Петербург

³ Институт токсикологии ФМБА, Санкт-Петербург

Cycloferon Efficiency in Children's and Adults' Hepatitis B and C Treatment: Systematic Review and Meta-Analysis Results

N. K. MAZINA, P. V. MAZIN, A. A. IPPOLITOVA, A. L. KOVALENKO

¹ Kirov State medical university, Kirov

² St. Petersburg Institute of Expert Doctors Improvement, St. Petersburg

³ Institute of Toxicology FMBA, St. Petersburg

Объектом исследования явился массив литературных данных, извлечённых из публикаций в рецензируемых научных журналах, по клинической эффективности таблеток и инъекционной формы препарата циклоферон при вирусном гепатите В и С. Цель работы — обобщённая оценка клинической эффективности циклоферона путём сравнения результатов (исходов) его использования на фоне базисной терапии острых и хронических гепатитов В и С с учётом неоднородности групп сравнения и изменчивости маркерных параметров отклика на препарат. В базу данных включили информацию по 1856 пациентам. Обобщённая группа контроля ($n=898$) получала традиционную фармакотерапию (активное плацебо), основная группа ($n=958$) дополнительно — циклоферон. Проведён сравнительный анализ формализованных параметров клинической эффективности циклоферона (повышение абсолютной и относительной пользы, отношение шансов, ЧБНЛ и др.) при лечении острых и хронических вирусных гепатитов В и С у взрослых и детей. Изменчивость показателей эффективности затрудняла однозначную интерпретацию результатов, однако, объединение однородных групп сравнения в процессе метаанализа повысило статистическую мощность исследования и позволило дать обобщённую оценку клинической эффективности препарата. Показано, что применение циклоферона для лечения и профилактики вирусных гепатитов В и С у взрослых и детей более чем двукратно повышает вероятность полной ремиссии и снижения рецидивов заболевания (ОШ=2,6 [2,4; 2,9], ЧБНЛ=6,7 [3,2; 9,8]).

Ключевые слова: циклоферон, вирусный гепатит В и С, метаанализ, отношение шансов, маркеры клинической эффективности, частотные характеристики, анализ гетерогенности и чувствительности

Objective: an array of special publications data extracted from reviewed scientific journals and concerning the efficacy of the Cycloferon drug in viral hepatitis B and C treatment. The aim of the work is a generalized evaluation of Cycloferon efficacy by comparison of the results (outcomes) of its use against the background of the basic therapy for acute and chronic hepatitis B and C. Heterogeneous groups' design and the variability of clinical response parameters were considered. The database included information about 1856 patients. Generalized control group ($n=898$) received standard drug therapy (active placebo). Experimental group ($n=958$) additionally received cycloferon. All groups included children and adults with viral B and C hepatitis. The comparative analysis of formalized parameters of clinical efficacy of cycloferon (increase of the absolute and the relative benefits, odds ratio, NNT, etc.) in the treatment of acute and chronic viral hepatitis B and C in adults and children. The variability of the parameters made it difficult to unambiguously interpret the results, however, the combination of homogeneous comparison groups in the meta-analysis process increased the statistical power of the study and allowed to perform a general assessment of the clinical efficacy of the drug. It has been shown that the use of Cycloferon for the treatment and prophylaxis of viral hepatitis B and C in adults and children more than doubles the probability of complete remission and relapse of the disease (OR = 2.6 [2.4; 2.9], NNT = 6.7 [3.2; 9.8]).

Keywords: cycloferon, viral hepatitis B and C, meta-analysis, odds ratio, markers of clinical effectiveness, frequency characteristics, heterogeneity and sensitivity analysis.

Введение

Острые и хронические вирусные гепатиты стали серьёзной медицинской проблемой, поскольку быстро распространяются в разных странах, трудны для выявления и чреваты тяжёлыми исходами (циррозом и раком печени) [1–6]. Так, в России заболевания этой группы выявлены примерно у 5 млн человек (из них хронический гепатит С — около 2 млн), во всем мире — до 400–570 млн [2, 7]. Если гепатиты, вызываемые возбудителями с пероральным путём передачи (типы А, Е и, вероятно, F) хронизируются весьма редко или же вообще не переходят в хронические формы, то гепатиты с парентеральным механизмом заражения (В, С, D, G) сопряжены с длительными малосимптомными процессами, тяжёлыми осложнениями и исходами [1]. Активно изучаются спорные гепатитоподобные возбудители типа TTV, Sen, однако их вклад в поражение печени пока окончательно не изучен [1].

Наиболее распространёнными и социально-значимыми возбудителями вирусных гепатитов остаются HBV и HCV (соответственно, вирусы-возбудители гепатита В и С). Каждый из них имеет сложную и не до конца ясную внутривидовую таксономию генотипов [1, 2].

Растёт количество серонегативных (прежде всего, HBeAg-негативных) хронических форм гепатита В, достигая показателя 70–90% [2]. С учётом того, что у значительной части (до 14,2%) пациентов инфекционный процесс в течение жизни реактивируется повторно, их мониторинг и диспансеризация составляют отдельную проблему, поскольку иммунологические показатели могут снижаться, в основном, за счёт недостаточности Т-клеточного звена. Особенно это выражено у представителей «групп риска»: инфицированных лиц мужского пола, пожилого возраста, коинфицированных несколькими вирусами гепатита (например, В и С) а так же ВИЧ, алкоголь- и наркозависимых [2].

HCV (возбудитель вирусного гепатита С) признан вирусом с рекордно-высокой изменчивостью. Он превосходит даже вирус гриппа и, как правило, оказывается неуловимым для иммунной системы организма [2]. Как HCV, так и HBV способны к внепеченочной репликации в периферических мононуклеарах, селезёнке, лимфатических узлах, клетках костного мозга, что становится причиной полиорганной симптоматики. Поэтому клиника хронических вирусных гепатитов зачастую ставит в тупик опытных специалистов, так как кроме слабо-симптомного или бессимптомного течения возникают формы с суставным синдромом, маскирующие ревматоидный артрит, с кожными лишае-подобными поражениями или вовлечением в процесс щитовидной железы [8].

Медикаментозные технологии борьбы с тяжёлыми, осложнёнными и сочетанными вирусны-

ми поражениями печени совершенствуются. Возрастает количество противовирусных агентов прямого действия, которые применяются и в режиме монотерапии, и в схемах совместного назначения: софосбувир + рибавирин, софосбувир + ледипасфир, софосбувир + даклатасвир или + велпатасвир, ледипасвир или велпатасвир в сочетании с тенофовиrom и др. [9]. Однако имеются проблемы безопасности таких назначений (возможна почечная токсичность) и серьёзные экономические ограничения в странах со слабой монетизацией здравоохранения: немногие пациенты могут позволить себе лечение противовирусными препаратами прямого действия [9]. Поэтому актуален поиск таких схем лечения вирусных гепатитов, которые бы сочетали в себе социально-экономическую доступность и фармакологическую безопасность.

Среди проблем борьбы с вирусными инфекциями — трудности доставки лекарственных агентов к расположенным внутри клетки вирусным частицам и развивающимся при длительной инфекции ослаблением иммунитета, повышенной частотой суперинфекций и бактериальных осложнений. Следовательно, важна разработка и совершенствование лекарственных средств, которые мобилизуют резервы систем специфической и неспецифической защиты организма, а также усиливают эффекты этих систем против отдельных возбудителей, их сочетаний и сопутствующих патологических проявлений.

Одной из таких фармакологических групп являются индукторы интерферона. Это соединения природного или синтетического происхождения, «включающие» синтез одноименных эндогенных противовирусных агентов [10,11]. Известны интерфероны 1-го и 2-го типов (INF- α/β и γ). Способность к индукции интерферонов у человека характеризуется сильной индивидуальной изменчивостью, что приводит к особенностям иммунного ответа и разной тяжести клинических проявлений вирусных инфекций. О роли интерферонов в сопротивлении макроорганизма инфекциям говорит то обстоятельство, что ведущим фактором вирулентности вируса Эбола, вызывающего особо тяжёлые и смертельные геморрагические лихорадки, является протеин VP35, ингибирующий продукцию интерферонов α и β через блокаду RIG-I-подобных сигнальных рецепторов [12].

Низкая индукция (недостаточная выработка) интерферонов (α и γ) ведёт к снижению реактивности пациентов во время манифестации вирусной инфекции. Это повышает частоту суперинфекций, обострений хронических воспалительных процессов в латентных очагах, опасность реинфекций и других бактериальных осложнений, в частности, связанных с активизацией условно-патогенной микрофлоры. Известен значительный вклад ин-

терферонов α и β не только в противодействие организма вирусам и бактериям, но и грибковым инфекциям, а также паразитарным инвазиям [13].

Интерфероны являются мощным средством защиты организма, что лежит в основе разных технологий их использования для лечения и профилактики многих заболеваний. Хотя разработаны такие высокотехнологические методики, как поликлональная стимуляция иммунцитов экзогенными интерферонами, в последние годы все более успешно развиваются именно индукторы эндогенных интерферонов [11], которые оказывают стимулирующее воздействие на органы и популяции клеток, подвергнутые атаке патогенного возбудителя, то есть демонстрируют специфичную фармакодинамику. Кроме того, у них нет аллергенности и других негативных эффектов, присущих экзогенным лекарственным веществам. Внутренняя индукция организмом собственных интерферонов, как правило, происходит под влиянием эндогенных контрольно-регуляторных механизмов, сбалансировано и без перенасыщения.

В настоящее время стандартное лечение хронического вирусного гепатита С предусматривает введение препаратов α -интерферона (ИФ- α) в комбинации с ежедневным назначением рибавирина на протяжении 6—12 мес подряд. Для повышения эффективности лечения ХВГС успешно применяют пегилированные ИФ в комбинации с рибавирином [14]. Однако исследования, осуществленные Кокрановским обществом доказательной медицины показали, что наряду с улучшением результатов лечения вирусного гепатита, их применение приводит к возрастанию частоты осложнений, в частности к тиреоидиту, и в результате — уменьшению приверженности больных к дальнейшему лечению [14].

Для повышения эффективности терапии рекомендуется также включение в курс стандартного лечения иммуномодуляторов, в том числе, тимозина и γ -ИФ [21], что повышает эффективность лечения за счет воздействия на иммунный ответ организма, а также снижает частоту и выраженность побочных реакций противовирусной терапии. В частности, установлена эффективность иммуномодуляторов-интерфероногенов в терапии хронического вирусного гепатита С в рамках совершенствования стандартного подхода к лечению таких больных [14].

Одним из широко применяемых в нашей стране препаратов данной группы является Циклоферон (метглюмина акридоната) (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», г. Санкт-Петербург) [15,16]. Это низкомолекулярный индуктор эндогенного интерферона, по химической структуре относящийся к классу акридонов. Циклоферон (ЦКФ) индуцирует синтез α -интерферона (INF- α) [15—17].

ЦКФ отличается широким спектром профилактического и лечебного действия при острых и хронических вирусных гепатитах С и В, поскольку прямо влияет на репликацию вирусов, а также проявляет интерферон-продуцирующие противовоспалительные и иммуно-корректирующие свойства [15]. При этом он не обладает аллергенностью или не провоцирует пирогенные реакции. При использовании ЦКФ пациентам не грозят мутагенный, тератогенный, канцерогенный, эмбриотоксический эффекты, он легко сочетается с разными лекарственными средствами и комбинируется с абсолютным большинством традиционных фармакологических агентов. ЦКФ является безопасным препаратом и может применяться в педиатрической и геронтологической практике [10, 11, 15—17]. При тяжёлых сопутствующих заболеваниях коррекция дозы, как правило, не требуется.

ЦКФ применяется в клинической практике более 15 лет и показания к его применению имеют тенденцию расширяться. Вопреки очевидным преимуществам препарата как самостоятельного иммуномодулятора, индуктора интерферогенеза и как компонента базисной терапии, он используется не достаточно широко. Более того, гетерогенность показателей клинической эффективности, полученных у разных исследователей, затрудняет однозначную интерпретацию результатов лечения и оценку преимуществ этого лекарства. В связи с этим цель нашей работы состояла в обобщённой количественной оценке клинической эффективности ЦКФ в таблетках и в виде раствора при лечении вирусных гепатитов В и С у взрослых и детей на основании результатов систематического обзора и последующего метаанализа опубликованных результатов контролируемых клинических исследований (РКИ).

Материал и методы

Систематический обзор и метаанализ в данном исследовании выполняли в соответствии с рекомендациями [18—21] по следующим этапам:

- поиск публикаций, содержащих результаты рандомизированных клинических исследований (РКИ) с данными по клинической эффективности ЦКФ (инъекционной и таблетированной форм) при лечении вирусных гепатитов В и С у детей и взрослых;
- обоснование принципов отбора публикаций для их включения или исключения в систематический обзор;
- абстрагирование данных конкретных исследований (частотных характеристик исходов) и перевод в унифицированные показатели клинической эффективности ЦКФ;
- сравнительный анализ данных методами описательной статистики и метаанализа в условиях гетерогенности показателей эффективности;
- определение диапазона изменчивости (устойчивости) оценок клинической эффективности с применением статистических моделей фиксированных и случайных эффектов в зависимости от лекарственной формы ЦКФ.

База данных для систематического обзора состояла из 531 публикации за период с 1998 по 2015 гг. по оценке клинической эффективности ЦКФ в разных лекарственных формах

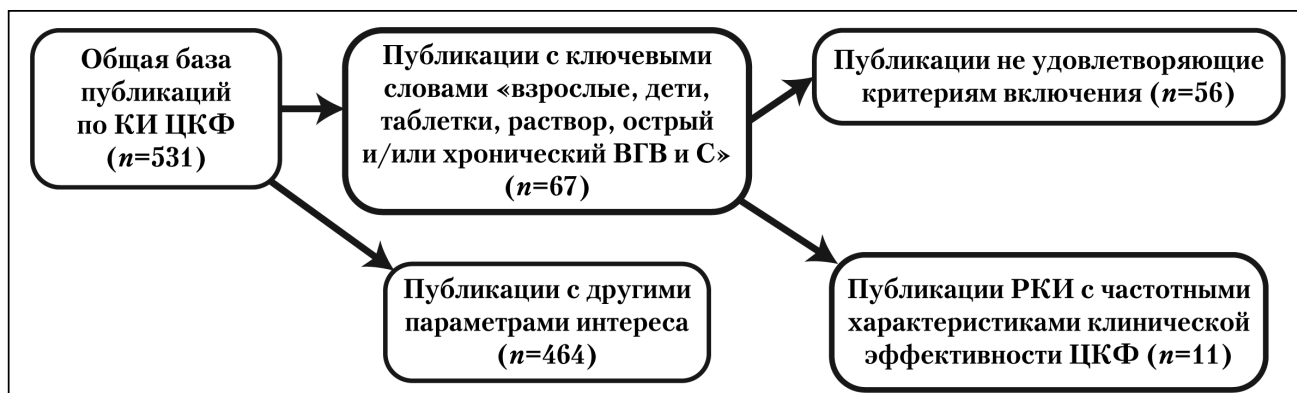


Рис. 1. Последовательность извлечения данных и проведения отбора публикаций для систематического обзора и последующего метаанализа.

при различных заболеваниях, связанных с вирусной инфекцией и иммунодефицитом, у детей и взрослых (рис. 1).

После анализа текстов по ключевым словам — «циклоферон, таблетки, раствор, взрослые, дети, острые и хронические гепатиты В и С» были отобраны 67 публикаций или 12,6%. Далее проверяли соответствие публикаций критериям включения–исключения согласно принятым правилам [19–23], адаптированным нами исходя из цели данного исследования:

- наличие группы сравнения, относительно которой оценивается эффективность ЦКФ (плацебо-группа или группа, получающая традиционные препараты — базисную или симптоматическую терапию как активное плацебо);
- численность пациентов, включенных в РКИ — не менее 20 человек; описание в тексте публикации критериев включения–исключения в группы сравнения РКИ;
- случайное распределение пациентов в группы сравнения, как минимум одинарное слепое исследование; полное отслеживание не менее 80% пациентов (от первоначально включённых) на всем протяжении исследования;
- представление частоты исходов (положительных, полезных или отрицательных, вредных) в группах сравнения в виде частот (%) по конечным точкам отсчёта эффективности ЦКФ в каждой группе сравнения (ремиссия полная, первичная, стабильная, вирусная, биохимическая, отсутствие репликации вирусных РНК, нормализация АлАТ и АсАТ, повторная заболеваемость в течение 3, 6, 12 мес после окончания лечения, отсутствие трансформации острого гепатита в хронический и др.);
- исход — клинически значимое явление у пациентов изучаемой и контрольной групп, которое является объектом интереса исследователя. При проведении клинических испытаний исходы служили критериями оценки эффективности воздействия ЦКФ в таблетках и в растворе.

По ним в систематический обзор, а затем, в метаанализ были включены материалы 2 публикаций по применению ЦКФ среди детей (6–18 лет) и 9 публикаций — у взрослых (19–55 лет), что составило 2,1% [10, 14–17, 24–28] от всего массива публикаций.

Извлеченные публикации соответствовали принятым критериям включения и содержали частотные характеристики (%) положительных (успешных) и отрицательных (неуспешных) исходов лечения в группах сравнения. Группы сравнения обозначали как контрольную, в которой все пациенты получали базисную терапию или симптоматическое лечение в качестве активного плацебо (БТ), и как основную, в которой пациенты получали дополнительно ЦКФ. К положительным (успешным) исходам относили (табл. 1): нормализация АлАТ и/или АсАТ через 2 мес, 6 мес; частоты первичной, стабильной, полной, вирусной, биохимической ремиссии; отсутствие репликации вирусных РНК ВГС в кро-

ви через 12 мес после окончания лечения; отсутствие рецидивов в течение 3, 6, 12 мес после окончания лечения; отсутствие трансформации острого гепатита в хронический; отсутствие маркера гепатита HBsAg через 3 мес; снижение ДНК HBV до неопределяемых цифр; улучшение самочувствия через 3 мес (опросник SF36); вирусологическую эффективность — HBV ДНК < 300 копий/мл PCR; сероконверсий по HBeAg-; потери HBsAg.

К отрицательным (неудачным) исходам относили, напротив, частоты отсутствия перечисленных позитивных сдвигов. Исключали публикации, которые не содержали частотных характеристик эффективности ЦКФ в обеих или в одной из групп сравнения; содержали ранее опубликованные оригинальные данные в виде обзора литературы; дизайн исследования не позволял выявить различия между группами сравнения (группировка производилась по исходному уровню интерферонотерапии); содержались сведения только по частотам побочных эффектов и отсутствовали сведения о клинической эффективности; количество пациентов, включенных в РКИ, было меньше 20 человек; численность групп сравнения не указывалась, хотя частотные характеристики эффектов в статье имелись.

На основе «положительных» и «отрицательных» клинических эффектов (табл. 2) была создана совокупность формализованных показателей клинической эффективности ЦКФ в таблетках и в растворе для поэтапного метаанализа в общепринятом [19–21] формате через вычисление унифицированных параметров ЧИЛ — частоты позитивных исходов в группе лечения с применением ЦКФ и ЧИК — частоты позитивных исходов в группе контроля только базисной (или симптоматической) терапии.

Из этих показателей рассчитывали унифицированные показатели эффективности — величина абсолютной и относительной клинической эффективности применения ЦКФ с профилактической или лечебной целью (ПАП и ПОП) по сравнению с базисной терапией, отношение шансов позитивного исхода (ОШ) и показатель ЧБНЛ — число больных, которых необходимо лечить дополнительно ЦКФ, чтобы достичь благоприятного исхода у одного больного [29].

При интерпретации результатов метаанализа с позиций доказательной медицины считают, что медицинское вмешательство обеспечивает достоверные и устойчивые различия между группами сравнения по исследуемому признаку («жесткая точка» или суррогатный показатель), если значения ПАП > 20%, а его 95% доверительные интервалы (ДИ) не содержат нуля. Значения ОШ, как отражения повышения шансов позитивного исхода должны превышать 1,0 и их log 95% ДИ не должны содержать значений меньше 1,0 [21–23, 30]. Результаты медицинского вмешательства клинически значимы, если ПОП > 25%, и высоко клинически значимы, если

Таблица 1. Обозначения патологических состояний и показателей исходов при вирусном гепатите В и С после применения ЦКФ на основании публикаций, соответствующих критериям включения в систематический обзор

№	Ссылка на публикации о результатах РКИ	Нозология, лекарственная форма ЦКФ	Параметры исходов и их обозначение
1	[17]	ХВГВ, раствор	1. Клинико-биохимический эффект (нормализация АлАТ) через 2 мес 2. Клинико-биохимический эффект (нормализация АлАТ) через 6 мес
2	[24]	ХВГС, таблетки ХВГС с 1в генотипом, таблетки	1. Частота полной ремиссии через 12 мес после окончания курса лечения 2. Частота полной ремиссии через 12 мес после окончания курса лечения
3	[15]	ОВГС, таблетки	1. Нормализация биохимических показателей — билирубин 2. Нормализация значений тимоловой пробы 3. Нормализация активности АсАТ 4. Нормализация активности АлАТ 5. Повышение продукции ИФ- α 6. Повышение продукции ИФ- γ
4	[16]	ОВГС, раствор ХВГС, раствор	1. Нормализация АсАТ после окончания лечения 2. Нормализация АлАТ после окончания лечения 3. Отсутствие репликативной активности ВГС через 1 мес после лечения 4. Отсутствие репликативной активности ВГС после окончания лечения 5. Исчезновение из крови РНК ВГС через 12 мес после окончания лечения 6. Отсутствие трансформации ОГ в ХГ через 12 мес после окончания лечения 7. Отсутствие рецидивов через 12 мес после окончания лечения 8. Нормализация АлАТ через 12 мес после окончания лечения 9. Первичная ремиссия 10. Прекращение репликации вируса через 12 мес после окончания лечения
5	[26]	ХВГС, раствор ХВГВ, раствор	1. Биохимический ответ (снижение АлАТ в >2 раза через 3 мес после начала лечения) 2. Отрицательная реакция HCV на 48 нед лечения 1. Элиминация вируса через 3 мес 2. Элиминация вируса после окончания лечения 3. Элиминация вируса через 6 мес после окончания лечения 4. Стабильная ремиссия
6	[10]	ОВГВ, раствор	1. Отсутствие маркера гепатита HBsAg через 3 мес
7	[25]	ХВГС, таблетки, раствор	1. Выход больных в первичную ремиссию 2. Выход больных в полную ремиссию 3. Выход больных в стабильную ремиссию 4. Нормализация АлАТ к окончанию терапии 5. Полный ответ на терапию через 12 мес 6. Стабильная ремиссия 7. Отсутствие побочных эффектов терапии 8. Снижение гипопротромбинемии
8	[27]	ХВГВ, таблетки	1. Субъективная оценка эффективности терапии — значительный эффект 2. Первичная полная ремиссия 3. Первичная биохимическая ремиссия 4. Отсутствие рецидива заболевания 5. Снижение ДНК HBV до неопределяемых цифр 6. Неполная биохимическая ремиссия (нормализация трансаминаз) после лечения 7. Неполная биохимическая ремиссия через 6 мес
9	[11]	ХВГС, таблетки	1. Нормализация АлАТ и элиминация вируса через 48 нед 2. Улучшение самочувствия через 3 мес (опросник SF36) 3. Гистологическое улучшение
10	[14]	ХВГС, таблетки, раствор	1. Ремиссия через 6 мес 2. Через 12 мес 3. Стабильная ремиссия
11	[28]	ХВГВ, ХВГС, таблетки	1. Через 24 нед у пациентов с HBeAg+ вирусологическая эффективность — HBV ДНК < 300 копий/мл PCR 2. Биохимическая эффективность — нормализация АлАТ 3. Сероконверсия по HBeAg- 4. Потеря HBsAg 5. Через 48 нед у пациентов с HBeAg+ Вирусологическая эффективность — HBV ДНК < 300 копий/мл PCR 6. Биохимическая эффективность — нормализация АлАТ 7. Сероконверсия по HBeAg- 8. Потеря HBsAg

ПОП > 50%. ЧБНЛ косвенно характеризует качество медицинского вмешательства и для эффективных медицинских технологий находится в диапазоне $10 > \text{ЧБНЛ} > 1$ [29].

Для анализа чувствительности определения ОШ оценивали внутригрупповую и межгрупповую гетерогенность показателей-откликов (по критерию χ^2 , $p < 0,1$) с вычислением индексов гетерогенности H и I и их 95% ДИ. Поскольку, цель работы состояла в объединении данных по эффективности одного и того же вмешательства (применения ЦКФ) при вирусных гепатитах В и С для обобщённого вывода о клинической эффективности по конкретным публикациям использовали методы фиксированных эффектов по Мантелю-Хензелю и случайных эффектов с учётом гетерогенности выборки [31–34], реализованных в программе WinPepi [35], доступной в сети Internet.

Проверку на устойчивость результатов в условиях гетерогенности показателей клинической эффективности проводили путём раздельного вычисления ОШ и 95% ДИ при применении ЦКФ в таблетках, инъекционной формы и после объединения групп. Ввиду малочисленности значимых данных по применению ЦКФ при вирусном гепатите у детей публикации по детям и взрослым объединили в единый массив.

Статистическую значимость различий в группах сравнения по частотным характеристикам разных параметров-откликов (ЧИЛ и ЧИК) оценивали по критерию χ^2 , который вычисляли по абсолютному количеству пациентов с определённым исходом профилактики или лечения («заболели», «не заболели», «осложнения» и др.). За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$ после сравнения с рассчитанным значением p . ОШ (отношение шансов улучшения исхода) и его 95% доверительные интервалы (95% ДИ) вычисляли с помощью калькулятора Effect Size, опубликованного в сети Internet [32].

Статистическую обработку результатов проводили поэтапно методами, реализованными в пакете программ STATISTICA 11.0 [22, 23]. В группах сравнения анализировали вид распределения данных по критериям Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors и Shapiro-Wilk's. Поскольку групповые значения используемых показателей-откликов имели разные степени отклонения от нормального распределения, то для анализа чувствительности описательные статистики представляли в формате $M (SD)$ где M — средняя, SD — среднеквадратичное отклонение и $[min, max]$ — минимальное и максимальное значения показателя.

Результаты исследования

Систематический обзор и последующий мета-анализ объединённых данных содержал данные РКИ, полученные при участии 1856 пациентов (детей и взрослых), из которых в группу, получающую ЦКФ включили 958 пациентов, а в группы БТ — 898 пациентов (табл. 2), в виде частоты позитивных исходов и рассчитанных унифицированных показателей клинической эффективности (табл. 3).

Точность оценки эффективности ЦКФ и её применимости для реальной практики достигались соблюдением «статистической симметричности» [20, 22, 30, 31] групп пациентов, тщательно подбираемых (с рандомизацией) для РКИ «по протоколу», который обязательно содержал сравнения «контрольной» и «опытной» групп по одинаковым параметрам-откликам. Для обеспечения достоверности всего комплекса опубликованных данных («внутренней обоснованности») в систематическом обзоре сопоставляли единые образные оценки и статистической, и клинической

кой значимости действия ЦКФ в разных независимых РКИ. Следовательно, аргументация позитивного действия ЦКФ в проекции на реальную медицинскую практику при острых и хронических вирусных гепатитах В и С, отличающуюся от условий конкретного РКИ своей гетерогенностью, приобретала, на наш взгляд, и теоретическую, и практическую убедительность («внешнюю обоснованность») [31].

Одним из подходов к обобщённой оценке изучаемого эффекта медицинского вмешательства, вопреки наличию статистической неоднородности, что неминуемо при многоцентровых исследованиях или в рамках систематического обзора, является метаанализ [19, 20] — метод статистической обработки, объединяющий гетерогенные данные, содержащиеся в публикациях результатов независимых РКИ. Отбираются опубликованные результаты исследований, объединённых целью и задачами, выполненных по однотипному дизайну, с характеристиками эффектов вмешательства, сопоставимыми по унифицированной шкале измерения эффекта в виде ПАП (повышение абсолютной пользы), ПОП (повышение относительной пользы), ОШ (отношение шансов улучшения исхода), ЧБНЛ (число больных, которых необходимо лечить традиционным способом в течение определённого времени для получения благоприятного исхода, сопоставимого с новым способом) с вычислением их 95% доверительных интервалов (95% ДИ) [29].

Совокупность опубликованных данных по характеристикам эффективности ЦКФ (см. табл. 1) сочетала однотипные верифицированные диагнозы и схемы фармакотерапии. Исследования проводились в разных городах и клиниках, независимо друг от друга, конфликт интересов отсутствовал. В публикациях приводили промежуточные («суррогатные») показатели эффективности ЦКФ и их частотные характеристики, которые с одной стороны были подвержены высокой индивидуальной изменчивости, но с другой, являлись конечными точками (заболеваемость, повторная заболеваемость в группах сравнения, осложнения и тяжесть проявлений основного заболевания), принятыми в системе оценки качества медицинской помощи [30].

Вычисление значений унифицированных параметров эффективности ЦКФ (табл. 3), произведённое на основании цифрового материала, представленного в публикациях, позволило определить статистическую значимость различий между частотами исходов по-отдельности (критерий $\chi^2 \gg$ критических значений и $p < 0,000...$) и в обобщённых группах (критерий знаков $z \gg$ критических значений и $p < 0,000...$).

Несмотря на широкий спектр колебаний частоты эффективности профилактики и лечения в

Таблица 2. Количественные характеристики групп сравнения по частоте позитивных исходов лечения и отсутствия значимых эффектов

№	Ссылка	Исходы	Число пациентов в РКИ	Численность БТ-группы	% (+)*	% (-)**	Численность группы ЦКФ	% (+)*	% (-)*
1	[17]	1			30	70		73	27
		2			5	95		60	40
2	[24]	1	35	15	67	33	20	50	50
		2	39	22	29	71	17	53	47
		1			41	59		66	34
		2			21	79		44	56
		3			21	79		66	34
		4			21	79		50	50
		5			9	91		21	79
		6			21	79		25	75
4	[16]	1			36	64		69	31
		2			52	48		84	16
		3			12	88		47	53
		4			16	84		61	39
		5			16	84		47	53
		6			8	92		45	55
		7			76	24		86,5	13,5
		8			32	68		62	38
		9			52	48		73	27
		10			4	96		31	69
5	[26]	1			28	72		46	54
		2			36	64		89	11
		3			44	56		50	50
		4			64	36		66	34
		5			41	59		46	54
		6			50	50		59	41
6	[10]	1	74	37	24	76	37	11	89
7	[25]	1			94	6		95	5
		2			66	34		73	27
		3			56	44		68	32
		4			83	17		93	7
		5			50	50		70	30
		6			56	44		68	32
		7			73	27		92	8
		8			8	92		20	80
8	[27]	1			29	71		45	55
		2			7	93		5	95
		3			13	87		20	80
		4			55	45		78	22
		5			44	56		33	67
		6			8	92		40	60
		7			5	95		15	85
9	[11]	1			56	44		65	35
		2			15	85		69	31
		3	40	18	38	62	22	58	42
10	[14]	1			48	52		91	9
		2			2	98		87	13
		3			64	36		85	15
11	[28]	1			5	95		40	60
		2			29	71		68	32
		3			18	82		30	70
		4			1	99		7	93
		5			38	62		46	54
		6			62	38		78	22
		7			20	80		38	62
		8			19	81		32	68

Примечание. * – % (+) – доля позитивных исходов; ** – % (-) – доля пациентов с отсутствием значимого эффекта.

группах сравнения, значения ЧИЛ в 93% случаев исходов превосходили значения ЧИК и составили в среднем 55,5 и 34,6%, соответственно. В обобщённой группе взрослых и детей, получав-

шей ЦКФ, позитивных исходов (ЧИЛ) наблюдали на 21% ($z=1,95$; $p=0,000...$) чаще, чем в группе пациентов, получавших БТ (ЧИК). Значения ПАП превышали порог 20% в 50% наблюдений,

Таблица 3. Влияние ЦКФ на клиническую эффективность (частота позитивных исходов) и другие унифицированные параметры результатов лечения ОВГ и ХВГ В и С типа у детей и взрослых

№	Ссылка	Исходы	Унифицированные параметры клинической эффективности ЦКФ							
			ЧИЛ, %	ЧИК, %	χ^2	<i>p</i>	ПАП, %	ПОП, %	ЧБНЛ	ОШ
1	[17]	1	73	30	6,44	0,011	43	144	2	6,42
		2	60	5	12,71	0,000...	55	1100	2	28,5
2	[24]	1	50	67	0,97	0,324	-17	-25	-6	0,5
		2	53	27	2,67	0,102	26	94	4	3
3	[15]	1	64	43	1,29	0,251	21	50	5	2,4
		2	43	21	1,47	0,225	21	100	5	2,75
		3	64	21	5,25	0,022	43	200	2	6,6
		4	50	21	2,49	0,115	29	133	4	3,67
		5	21	7	1,18	0,28	14	200	7	3
		6	29	21	0,19	0,66	7	33	14	1,47
4	[16]	1	69	36	7,58	0,006	33	93	3	4,3
		2	84	52	8,42	0,004	32	61	3	4,73
		3	47	12	8,87	0,003	35	291	3	6,49
		4	61	16	13,63	0,000...	45	283	2	8,29
		5	47	16	6,81	0,009	31	193	3	4,64
		6	45	8	10,28	0,001	37	461	3	9,37
		7	86	76	1,1	0,299	10	13	10	1,89
		8	62	32	5,91	0,015	30	92	3	3,4
		9	73	52	3,35	0,067	21	41	5	2,5
		10	31	4	7,03	0,008	27	669	4	10,67
5	[26]	1	46	28	2,69	0,1	18	64	6	2,18
		2	90	36	24,2	0,000...	54	150	2	15,6
		3	50	44	24,2	0,000...	6	15	16	11
		4	66	64	0,068	0,793	2	3	48	1,03
		5	46	41	0,308	0,579	5	11	22	1,2
		6	59	50	1,14	0,286	9	18	11	1,43
6	[10]	1	5	24	2,33	0,127	-19	-78	-5	0,44
7	[25]	1	95	94	0,062	0,798	1	1	73	1,3
		2	73	66	0,586	0,486	8	11	13	1,43
		3	68	56	0,176	0,675	12	21	8	1,42
		4	94	83	2,97	0,085	12	14	9	3,32
		5	70	50	3,74	0,053	20	40	5	2,33
		6	68	55	1,59	0,206	13	24	8	1,74
		7	88	73	3,49	0,062	16	21	6	2,78
		8	20	8	2,81	0,094	13	167	8	3,06
8	[27]	1	45	29	5,49	0,019	16	55	6	2,4
		2	5	7	0,355	0,552	-2	-29	-50	0,7
		3	20	13	1,78	0,182	7	54	14	1,6
		4	78	55	11,87	0,001	23	42	4	2,9
		5	33	44	2,56	0,11	-11	-25	-9	0,63
		6	40	8	28,1	0,000...	32	400	3	7,7
		7	15	5	5,56	0,016	10	200	10	3,35
9	[11]	1	65	56	0,778	0,376	9	17	11	1,48
		2	70	14	31,7	0,000...	56	400	2	65
		3	59	39	8,29	0,004	20	52	5	3,31
10	[14]	1	91	48	3,76	0,052	43	88	2	2,26
		2	87	2	27,5	0,000...	85	5626	1	14,2
		3	85	64	1,62	0,21	22	34	5	2,27
11	[28]	1	40	5	43,02	0,000...	35	763	3	12,8
		2	68	29	98,9	0,000...	39	135	3	5,23
		3	30	18	16,15	0,000...	12	65	8	2,15
		4	7	1	14	0,000...	6	477	17	6,1
		5	46	38	4,09	0,043	8	21	13	1,38
		6	78	62	19,7	0,000...	16	26	6	2,2
		7	38	20	25,5	0,000...	18	90	6	2,45
		8	32	19	28,4	0,000...	13	67	8	2,6

Примечание. ОВГ — острый вирусный гепатит; ХВГ — хронический вирусный гепатит В и С типа у детей и взрослых.

ПОП превышало 25% в 74% наблюдений, что свидетельствовало и о клинической, и о статистической значимости различий эффективности ЦКФ и БТ. Средние значения ПАП составили 21

(18)%, ПОП — 236 (101)%, что подтверждало высокий уровень клинической значимости различий между группами сравнения по совокупности однотипных, но независимых РКИ.

Показатель ЧБНЛ, характеризующий качество медицинской помощи и эффективность ЦКФ, также не превышал значения 10 в 72% случаев наблюдений, при этом его абсолютная усреднённая величина составила 6,7 [95% ДИ — 3,2; 9,9], что также отражало более благоприятный профиль клинической эффективности ЦКФ по сравнению с традиционной противовирусной БТ или симптоматическим лечением гепатопротекторами.

Неоднородность маркеров, отражающих эффективность ЦКФ при разных типах вирусных гепатитов, ограниченность времени и ресурсов для проведения РКИ при анализе данных литературы формировали объективный источник неопределённости, затрудняющий однозначную интерпретацию результатов. Однако этому противостоял позитивный объединяющий фактор, который заключался в том, что патологические состояния вирусной природы поддавались неизменной коррекции ЦКФ (в инъекциях и таблетках) в группах пациентов разного возраста, что отражало универсальность и неспецифичность иммуномодуляции этим препаратом. Формально объединяя опубликованные данные, мы условно имитировали популяционный уровень изменчивости успешного использования ЦКФ при различных вирусных гепатитах в разных клиниках разными группами специалистов.

Данные, полученные в отдельных публикациях РКИ по ЦКФ, как правило, свидетельствовали что в «идеальных» условиях контролируемых наблюдений в пределах одного ЛПУ (рандомизации, наличия групп сравнения, критериев включения–исключения, верификации диагнозов, их относительной однородности, мониторинг однотипного лечения экспертами предметной области неукоснительно соблюдался) иммуномодулирующие эффекты ЦКФ проявлялись весьма чётко, формируя клинически значимые и статистически достоверные различия между группами сравнения (см. табл. 3).

Величина и характер изменчивости конечного результата при переходе к систематическому обзору имитировали реальную медицинскую практику, уровень гетерогенности популяции пациентов, которые, вероятно, наблюдаются в реальности. Поэтапная оценка внутренней и внешней гетерогенности является неотъемлемым элементом метаанализа, позволяет избежать систематической ошибки и получить объединённую количественную оценку клинической эффективности препарата [18, 20, 22].

Согласно полученным значениям унифицированных показателей клинической эффективности (см. табл. 3) провели сравнительный анализ и графическое представление (рис. 2) сдвига ОШ (по оси абсцисс) в пользу применения ЦКФ при вирусных гепатитах с оценкой внешней и

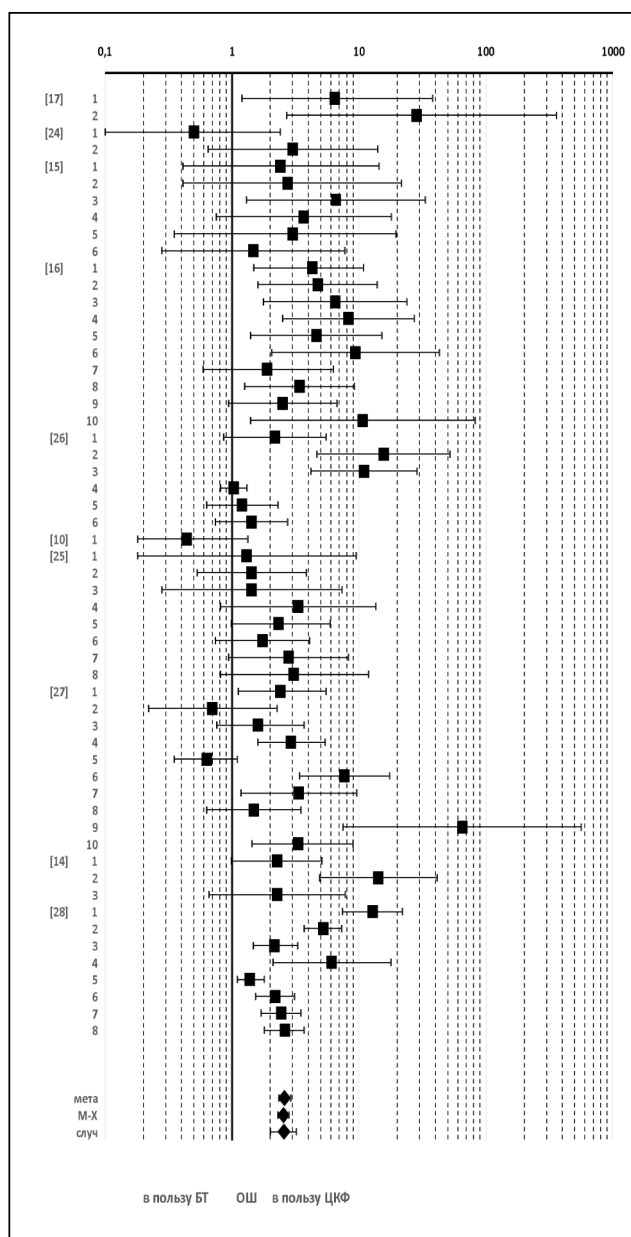


Рис. 2. Отношение шансов позитивного исхода под влиянием ЦКФ при остром и хроническом вирусном гепатите типа В и С у взрослых и детей после вычисления по совокупности оценочных показателей, представленных в публикациях.

Обозначения: точки в виде квадратов — таблетированная и инъекционная формы ЦКФ; горизонтальные «усы» — десятичные логарифмы 95% ДИ; в квадратных скобках — ссылки на публикации, включенные в систематический обзор и метаанализ, как в табл. 1; ось абсцисс — $\lg OШ$; $\lg OШ=1$ — линия нулевого эффекта; ромбовидные точки — обобщенные значения $\lg OШ$ в метаанализе (мета) с поправками на фиксированные (модель Ментеля-Ханзеля, М-Х) и случайные эффекты (случ).

внутренней гетерогенности и вычислением обобщённого значения IgОШ («мета») с двумя статистическими поправками на неоднородность исследований:

а) по методу Мантеля-Хензеля в модели фиксированных эффектов (обозначение — «М-Х»);

б) при допущении случайности эффектов (обозначение — «случ.»).

ЦКФ в схемах лечения вирусного гепатита (острого и/или хронического типа В или С) обеспечивал сдвиг вправо по оси абсцисс обобщённой оценки IgОШ (по совокупности оценочных показателей, указанных в табл. 3) и составлял 2,6 (95% ДИ от 2,4 до 2,9), с незначительным уменьшением за счет поправки на фиксированный эффект по Мантелю-Хензелю — до 2,55 (95% ДИ от 2,3 до 2,8).

При переходе к более «жесткой» поправке на случайность эффектов и с учётом гетерогенности параметров-откликов оценка IgОШ позитивных исходов изменялась незначительно до 2,57 с расширением диапазона 95% ДИ от 2,0 до 3,2, оценка гетерогенности по χ^2 составляла 221,4, $p=0,000...$, коэффициент гетерогенности $H = 2,0$ (95% ДИ от 1,8 до 2,3), индекс гетерогенности — $I^2 = 75,6\%$ (95% ДИ от 68,4 до 81,2%), что подтверждало о высокую гетерогенность данных.

Для проверки устойчивости оценок провели перегруппировку данных клинической эффективности ЦКФ отдельно для таблеток или инъекций. Проявилась аналогичная ситуация:

— при обобщённой оценке клинической эффективности ЦКФ в таблетках IgОШ позитивных исходов ЦКФ составил 2,8 (95% ДИ от 2,5 до 3,1), с поправкой на фиксированный статистический эффект по Мантелю-Ханзелю ОШ=2,7 (95% ДИ от 2,4 до 3,2) и с поправкой на случайный эффект — 2,8 (95% ДИ от 2,0 до 3,8), то есть, с небольшим расширением диапазона 95% ДИ. Оценочные параметры гетерогенности практически не изменялись: гетерогенность по χ^2 состави-

ла 204,1, $p=0,000...$, коэффициент гетерогенности $H = 2,6$ (95% ДИ от 2,2 до 3,0), индекс гетерогенности — $I^2 = 84,8\%$ (95% ДИ от 79,6 до 88,7%); — при обобщённой оценке клинической эффективности ЦКФ в инъекциях IgОШ позитивных исходов составил 2,45 (95% ДИ от 2,0 до 3,0), с поправкой на фиксированный статистический эффект по Мантелю-Ханзелю IgОШ = 2,43 (95% ДИ от 2,0 до 2,95) и с поправкой на случайный эффект — 2,82 (95% ДИ от 2,0 до 3,9), то есть, с небольшим расширением диапазона 95% ДИ. При этом оценочные параметры гетерогенности изменились в сторону её уменьшения: оценка гетерогенности по χ^2 составила 54,8, $p=0,000...$, коэффициент гетерогенности $H = 1,6$ (95% ДИ от 1,2 до 2,0), индекс гетерогенности — $I^2 = 61,7\%$ (95% ДИ от 40,4 до 75,1%);

В условиях допущения случайности позитивных эффектов ЦКФ в независимых РКИ с учётом гетерогенности опубликованных данных, вероятность достижения позитивных клинических результатов лечения вирусных гепатитов оставалась высокой (более чем двукратной) по сравнению с БТ или симптоматической терапией и устойчивой с сохранением статистической значимости (нижние пределы колебаний 95% ДИ значений показателей IgОШ не достигали значений $\leq 1,0$).

Заключение

На основании результатов метаанализа можно утверждать, что применение ЦКФ (в таблетках или в виде инъекций) в качестве профилактического и лечебного средства при острых и хронических вирусных гепатитах типа В и С у детей и взрослых повышает шансы ускоренного выздоровления и устойчивой ремиссии заболевания более, чем в 2 раза по сравнению с традиционными схемами противовирусной и симптоматической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лысанов Ю. И., Шаманова Л. В. Вирусные гепатиты: распространенность и динамика заболеваемости. Сибир мед журн 2011; 4: 110—113. / Lysanov Ju. I., Shamanova L. V. Virusnye gepatity: rasprostranennost' i dinamika zabolevaemosti. Sibir med zhurn 2011; 4: 110—113. [in Russian]
2. Фазылов В. Х. Этиологические и патогенетические аспекты диагностики и лечения вирусных гепатитов. Казан мед журн 2013; 6: 785—792. / Fazylov V. H. Jetiologicheskie i patogeneticheskie aspekty diagnostiki i lechenija virusnyh gepatitov. Kazan med zhurn 2013; 6: 785—792. [in Russian]
3. Bang C.S., Kang H.Y., Choi G.H., Kim S.B. et al. The Performance of Serum Biomarkers for Predicting Fibrosis in Patients with Chronic Viral Hepatitis. Korean J Gastroenterol 2017 May 25; 69 (5): 298—307.
4. Fu X.T., Shi Y.H., Zhou J., Peng Y.F. et al. Association of hepatitis status with surgical outcomes in patients with dual hepatitis B and C related hepatocellular carcinoma. Infect Agent Cancer 2017 May 25; 12: 28.
5. Wang X., Oishi N., Shimakami T., Yamashita T. et al. Hepatitis B virus X protein induces hepatic stem cell-like features in hepatocellular carcinoma by activating KDM5B. World J Gastroenterol 2017 May 14; 23 (18): 3252—3261.
6. Wei X., Wei H., Lin W., Hu Z. et al. Cell death biomarker M65 is a useful indicator of liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis B: A cross-sectional study of diagnostic accuracy. Medicine (Baltimore). 2017 May; 96 (20): e6807.
7. Косаговская И. И. Волчкова Е. В. Медико-социальные аспекты вирусных гепатитов с парентеральным путем передачи. Эпидемиол инфекц бол 2013; 1: 28—39. / Kosagovskaja I. I. Volchkova E. V. Mediko-social'nye aspekty virusnykh gepatitov s parenteral'nym putem peredachi. Jepidemiol infekc bol 2013; 1: 28—39. [in Russian]
8. Шекшина Е. В., Балабанова Р. М. Суставной синдром при вирусных гепатитах В и С и ревматоидный артрит: проблемы диагностики и лечения. Научно-практ ревматол 2005; 2: 53—55. / Shekshina E. V., Balabanova R. M. Sustavnoj sindrom pri virusnykh gepatitakh V i S i revmatoidnyj artrit: problemy diagnostiki i lechenija. Nauchno-prakt revmatol 2005; 2: 53—55. [in Russian]
9. Luetkemeyer A.F., Wyles D.L. CROI 2017: Highlights of Advances in Viral Hepatitis and Liver Fibrosis. Top Antivir Med 2017 May/Jun; 25 (2): 84—92.
10. Романцов М.Г., Баранова И.Г., Сологуб Т.П. Острый вирусный гепатит В: подходы к терапии. Врач 2007; 4: 32—35. / Romancov M.G., Baranova I.G., Sologub T.P. Ostryj virusnyj gepatit V: podkhody k terapii. Vrach 2007; 4: 32—35. [in Russian]
11. Романцов М.Г., Кремень Н.В., Сологуб Т.В. Иммуномодуляторы в терапии хронического гепатита С: совершенствование стандартного подхода Эксперимент клин фармакол 2010; 4: 14—17. / Romancov M.G., Kremen' N.V., Sologub T.V. Immunomodulatory v terapii khronicheskogo gepatita S: sovershenstvovanie standartnogo pod-khoda Jeksperimen klin farmakol 2010; 4: 14—17. [in Russian]

12. Luthra P., Aguirre S., Yen B.C., Pietzsch C.A. et al. Topoisomerase II inhibitors induce dna damage-dependent interferon responses circumventing ebola virus immune evasion. *MBio* 2017 Apr 4; 8 (2). pii: e00368—17.
13. Niedźwiedzka-Rystwej P., Ratajczak W., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W. Mechanisms of type I interferon action and its role in infections and diseases transmission in mammals. *Acta Biochim Pol* 2017; 64 (2): 199—205.
14. Фролов В. М., Соцкая Я. А. Эффективность комплексной иммунокоррекции при лечении хронического вирусного гепатита С. Тер архив 2012; 6: 60—65. / Frolov V. M., Sockaja Ja. A. Jefferktivnost' kompleksnoj immuno-korrekcii pri lechenii khronicheskogo virusnogo gepatita S. Ter arkhiv 2012; 6: 60—65. [In Russian]
15. Еришов Ф. И., Мезенцева М. В., Коваленко А. Л., Быченко Д. В., Касьянова Н. В. Циклоферон в терапии острого гепатита с у наркоманов. Клини фармакол тер 2000; 1: 89—91. / Ershov F. I., Mezenceva M. V., Kovalenko A. L., Bychenko D. V., Kas'janova N. V. Cikloferon v terapii ostrogo gepatita s u narkomanov Klin farmakol ter 2000; 1: 89—91. [In Russian]
16. Малый П. В., Пеньков Д. Б., Гололобова О. В., Лядова Т. И. Влияние терапии циклофероном на течение и исходы острого и хронического вирусного гепатита С. Вест СВГМУ им. И. М. Мечникова 2005; 4: 141—145. / Malij P. V., Pen'kov D. B., Gololobova O. V., Ljadova T. I. Vlijanie terapii cikloferonom na techenie i iskhody ostrogo i khronicheskogo virusnogo gepatita S. Vest SVGMU im. I. M. Mechnikova 2005; 4: 141—145. [In Russian]
17. Агаева С. Г. Влияние противовирусной терапии на течение хронического гепатита В у детей. Дет инфекц 2004; 1: 33—35. / Agaeva S. G. Vlijanie protivovirusnoj terapii na techenie khronicheskogo gepatita V u detej. Det infekc 2004; 1: 33—35. [In Russian]
18. Власов В. В. Эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005; 464. / Vlasov V. V. Jepidemiologija. M.: GJeOTAR-Media, 2005; 464. [In Russian]
19. Джалалаев С. Ч., Джалалаева Д. Х., Хюч Д. С. Роль систематического обзора и мета-анализа при оценке технологий в здравоохранении. Мед технол Оценка и выбор. 2012; 3: 10—16. / Dzhallalajev S. Ch., Dzhallalajeva D. Kh., Khoch D. S. Rol' sistematicheskogo obzora i meta-analiza pri ocenke tekhnologij v zdravookhraneni. Med tekhnol Ocenka i vybor. 2012; 3: 10—16. [In Russian]
20. Петров В. И. Базисные принципы и методология доказательной медицины. Вест ВолГМУ 2011; Выпуск 2 (38): 3—8. / Petrov V. I. Bazisnye principy i metodologija dokazatel'noj mediciny. Vest VolgGMU 2011; Vypusk 2 (38): 3—8. [In Russian]
21. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. М.: Медиа-Сфера. 1998; 352. / Fletcher R., Fletcher S., Vagner Je. Klinicheskaja jepidemiologija. Osnovy dokazatel'noj mediciny. M.: Media-Sfera. 1998; 352. [In Russian]
22. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа-Сфера, 2002; 312. / Rebrova O. Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA. M.: MediaSfera, 2002; 312. [In Russian]
23. Сергиенко В. И., Бондарева И. Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М.: «ГЭОТАР-МЕД», 2001; 256. / Sergienko V. I., Bondareva I. B. Matematicheskaja statistika v klinicheskikh issledovaniyakh. M.: «GJeOTAR-MED», 2001; 256. [In Russian]
24. Кетлинская О. С., Горячева Л. Г. Клинико-экономический анализ эффективности противовирусной терапии у детей, больных хроническим гепатитом С. Вест СВГМУ им. И. М. Мечникова 2007; 1: 37—44. / Ketlinskaja O. S., Gorjacheva L. G. Kliniko-jekonomicheskij analiz jefferktivnosti protivovirusnoj terapii u detej, bol'nykh khronicheskim gepatitom S. Vest SVGMU im. I. M. Mechnikova 2007; 1: 37—44. [In Russian]
25. Романцов М. Г., Сологуб Т. В., Горячева Л. Г., Коваленко С. Н., Суханов Д. С., Шульдяков А. А., Бондаренко А. Н., Коваленко А. Л., Петров А. Ю. Патогенетически обоснованная, с оценкой качества жизни, расчётом риска исхода заболевания, терапия больных вирусом гепатитом С (клинический обзор). Антибиотики и химиотер 2010; 3—4: 45—55. / Romancov M. G., Sologub T. V., Gorjacheva L. G., Kovalenko S. N., Sukhanov D. S., Shul'djakov A. A., Bondarenko A. N., Kovalenko A. L., Petrov A. Ju. Patogeneticheski obosnovannaja, s ocennoj kachestva zhizni, raschjotom riska iskhoda zabolevanija, terapija bol'nykh virusom gepatitom S (klinicheskij obzor). Antibiotiki i khimioter 2010; 3—4: 45—55. [In Russian]
26. Сологуб Т. В., Романцов М. Г. и др. Современные подходы к терапии вирусных гепатитов. Циклоферон. Terra medica nova 2006; 3: 1—5. / Sologub T. V., Romancov M. G. i dr. Sovremennye podkhody k terapii virusnykh gepatitov. Cikloferon. Terra medica nova 2006; 3: 1—5. [In Russian]
27. Сологуб Т. В., Шульдяков А. А., Горячева Л. Г., Баранова И. П., Линькова Ю. Н., Коваленко А. Л., Романцов М. Г. Эффективность использования циклоферона в терапии хронического гепатита В (результаты рандомизированных многоцентровых исследований) Антибиотики и химиотер 2010; 9—10: 37—41. / Sologub T. V., Shul'djakov A. A., Gorjacheva L. G., Baranova I. P., Lin'kova Ju. N., Kovalenko A. L., Romancov M. G. Jefferktivnost' ispol'zovanija cikloferona v terapii khronicheskogo gepatita V (rezul'taty randomizirovannykh mnogocentrovnykh issledovanij) Antibiotiki i khimioter 2010; 9—10: 37—41. [In Russian]
28. Стельмах В. В., Оковитый С. В., Романцов М. Г., Туан Н. Х., Оюнгелер М. Меглумин акридонат в комбинированной терапии больных HBeAg-позитивных хроническим гепатитом В. Груз мед нов 2013; 6: 33—39. / Stel'makh V. V., Okovityj S. V., Romancov M. G., Tuan N. Kh., Ojungerel M. Megljumin akridonacetat v kombinirovannoj terapii bol'nykh HBeAg-pozitivnykh khronicheskim gepatitom B. Gruz med nov 2013; 6: 33—39. [In Russian]
29. Moore A., McQuay H. Что такое NNT? Клини фарм и терапия 2000; 9: вып. 2: 84—86.
30. Хабриев Р. У., Юрьев А. С., Авксентьева М. В., Воробьев П. А., Горбунов С. Н. Методические подходы к формированию актуальных индикаторов качества медицинской помощи. Проблемы стандарт здравоохранения. 2005; 8: 9—15. / Khabriev R. U., Jur'ev A. S., Avksent'eva M. V., Vorob'ev P. A., Gorbunov S. N. Metodicheskie podkhody k formirovaniju aktual'nykh indikatorov kachestva medicinskoj pomoshhi. Problemy standart zdravookhraneni. 2005; 8: 9—15. [In Russian]
31. Тарасенко Ф. П. Прикладной системный анализ. Наука и искусство решения проблем. Томск, 2004; 186. / Tarasenko F. P. Prikladnoj sistemnyj analiz. Nauka i iskusstvo reshenija problem. Tomsk, 2004; 186. [In Russian]
32. Effect Size — <https://www.campbellcollaboration.org/escalc/html/EffectSizeCalculator-OR1.php> [Электронный ресурс] (Дата обращения 10—22 марта 2017 г.). / Effect Size — <https://www.campbellcollaboration.org/escalc/html/EffectSizeCalculator-OR1.php> [Elektronnyj esurs] (Data obrashhenija 10—22 marta 2017 g.).
33. Mantel N., Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl. Cancer Inst* 1959; 22 (4): 719—748.
34. Mulrow C., Langhorne P., Grimshaw J. Integrating heterogeneous pieces of evidence in systematic reviews. *Ann Intern Med* 1997; 127: 8: 989—995.
35. WinPepi Portal — www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мазина Надежда Константиновна — доктор медицинских наук, зав. каф. фармакологии Кировского ГМУ Минздрава России, Киров

Мазин Павел Владимирович — ассистент каф. фармакологии Кировского ГМУ Минздрава России, Киров

Ипполитова Александра Альбертовна — к. м. н., ассистент кафедры гуманитарных наук ФГБУ ДПО «Санкт-Петербургский институт усовершенствования врачей-экспертов» Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации; Санкт-Петербург

Коваленко Алексей Леонидович — д. б. н., дважды лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники, ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России; Санкт-Петербург

Базисные подходы к оценке эффективности лечения синдрома спастичности у детей с детским церебральным параличом препаратами ботулинического токсина типа А

А. П. СОЛОВЬЕВА, Д. В. ГОРЯЧЕВ, В. В. АРХИПОВ, Н. Д. БУНЯТЯН.

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

The Basic Approach to the Evaluation of the Effectiveness of Treatment of Spasticity Syndrome in Children with Cerebral Palsy with Botulinum Toxin Type A Drugs

A. P. SOLOVYOVA, D. V. GORYACHEV, V. V. ARHIPOV, N. D. BUNYATYAN

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow

Рассмотрены основные шкалы и тесты, применяемые в клинических исследованиях и практической медицине при оценке эффективности терапии синдрома спастичности препаратами ботулинического токсина типа А у детей с детским церебральным параличом. Приведены сведения о рекомендованных методах оценки, предложены шкалы, которые могут быть использованы при проведении оценки эффективности, проведён анализ их информативности и чувствительности.

Ключевые слова: ботокс, Диспорт, ботулинический токсин типа А, ДЦП, Шкала оценки глобальных моторных функций, шкала Эшворта, Шкала оценки результатов лечения, дети-инвалиды, модифицированная шкала Тардьё.

The article covers basic scales and tests used in clinical trials and medical practice for the assessment of the effectiveness of treatment of spasticity syndrome with preparations of botulinum toxin type A in children with cerebral palsy. The article gives the information about the recommended methods of assessment, suggests the scales that can be used in evaluation of the effectiveness, as well as carries out an analysis of their informativity and sensitivity.

Keywords: Dysport, Botox, botulinum toxin type A, Cerebral palsy, Gross Motor Function Classification System, Ashworth scale, Tardieu Spasticity Scale.

Введение

При оценке результатов клинического применения лекарственного препарата (ЛП) учитываются три основных его свойства: безопасность, эффективность, соотношение ожидаемой пользы к возможному риску его применения. Поэтому переменные ответа, выбранные для оценки изучаемых эффектов ЛП, являются ключевым показателем. Первичная конечная точка отражает клинически значимые эффекты, а вторичные конечные точки измеряют другие эффекты ЛП, которые могут не иметь отношения к первичной конечной точке, но в целом они составляют ту совокупность данных, которая позволяет оценить эффективность терапии. Как субъективные, так и объективные методы измерения конечных точек должны быть валидированы и удовлетворять соответствующим стандартам по точности, прецизионности, воспроизводимости, надёжности и реактивности, то есть чувствительности к изменениям во времени. При

применении лекарственных средств (ЛС) у детей это имеет крайне важное значение, особенно в тех случаях, когда речь идет о длительной терапии.

Реабилитация детей с детским церебральным параличом (ДЦП) включает консервативное медикаментозное и хирургическое лечение, физиолечение, лечебную физкультуру и массаж, кинезио- и механотерапию, психолого-педагогическое, логопедическое и дефектологическое сопровождение, трудо- и арт-терапию, ортезирование и прочее. При ДЦП лекарственная терапия направлена на коррекцию того или иного симптома или осложнения заболевания. Терапия спастичности играет ключевую роль в реабилитации детей, что делает необходимым всестороннюю оценку её эффективности. В настоящее время в качестве базисной терапии локальной спастичности рассматриваются препараты ботулинического токсина типа А (БТА), механизм действия которых состоит в блокировании высвобождения ацетилхолина на пресинаптическом уровне.

Данный обзор посвящён наиболее широко используемым шкалам и тестам, применяемым как в клинических исследованиях, так и в практической работе, позволяющим судить об эффек-

© Коллектив авторов, 2017

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

тивности препаратов БТА в комплексной терапии ДЦП у детей.

По мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время в мире количество инвалидов в детской популяции составляет 2–3%. Частота ДЦП в популяции составляет 2,5 на 1000 живых новорожденных [1]. По данным отечественных эпидемиологов, в России распространённость зарегистрированных случаев ДЦП составляет от 2,2 до 3,3 случаев на 1000, а в Москве — 1,9 на 1000 детей. По последним статистическим данным, в настоящее время в Москве проживает более 10 000 больных различного возраста с диагнозом ДЦП, из которых 4500 составляют дети и подростки [2].

Детские церебральные параличи представляют собой гетерогенную группу клинических синдромов, общим для которых является непрогрессирующее нарушение двигательных функций и позы. 80% всех детских церебральных параличей представляют собой спастические формы, основным симптомом которых является патологическое повышение мышечного тонуса — спастичность. Спастичность рассматривается как комбинированное поражение пирамидных и экстрапирамидных структур внутри головного или спинного мозга [3].

Спастичность при ДЦП имеет ряд особенностей: наличие патологических тонических рефлексов; появление патологической синкинетической активности при выполнении произвольных движений; нарушение координаторных взаимодействий мышц синергистов и антагонистов, так называемый феномен ко-контракции; повышение общей рефлекторной возбудимости (наличие четко выраженного стартл-рефлекса). Спастичность у детей с ДЦП приводит к формированию патологического двигательного стереотипа от минимального повышения мышечного тонуса в раннем возрасте до формирования контрактур в поздней резидуальной стадии заболевания. На ранней стадии болезни нарушения мышечного тонуса приводят к ограничению функциональных возможностей пациента, что в итоге ведёт к двигательному дефициту. Со временем формируются патологические установки в вертикальном положении, приводящие к формированию контрактур, подвывихов и вывихов суставов. В то же время лечение гипертонуса необходимо только в том случае, если он приводит к функциональным нарушениям, так как нередко гипертонус у детей с ДЦП может играть положительную роль, улучшая, в некоторой степени, двигательную деятельность.

Лечение начинают при спастичности умеренной степени выраженности. При генерализованной спастичности показано назначение пероральных антиспастических препаратов. Базовыми антиспастическими препаратами в мире признаны баклофен, тизанидин, бензодиазепины и дантролен.

В России препаратом выбора в педиатрии традиционно считается миорелаксант центрального действия толперизон. При выраженной спастичности рекомендуется применение препарата баклофен. При этом миорелаксанты системного действия не обладают избирательностью и снижают мышечный тонус всей скелетной мускулатуры, а не только спастических мышц. Указанные в международных научных обзорах по лечению спастичности при ДЦП диазепам, дантролен и другие ЛП в настоящее время в России не рекомендованы к применению у детей с ДЦП.

В то же время единственным методом снижения локальной спастичности с уровнем доказательности А признана терапия препаратами ботулинического токсина типа А. Внутримышечное введение БТА позволяет локально, обратимо и дозо-зависимо снизить мышечный тонус на срок до 3–6 и более месяцев [4].

История применения ботулинического токсина типа А

Ботулинический токсин представляет собой экзотоксин, продуцируемый спорообразующими анаэробными бактериями *Clostridium botulinum*. Ботулинический токсин — это полипептид, состоящий из лёгкой (50 кДа) и тяжёлой (100 кДа) цепей, соединённых дисульфидными мостиками и атомом цинка. В настоящее время известно 7 серотипов ботулотоксина (А, В, С, D, E, F, G), схожих по первичной и третичной структуре и по функции. Помимо этого, ботулотоксин по своей структуре гомологичен столбнячному токсину. Все серотипы ботулинического токсина связываются с одним и тем же рецептором, но воздействуют на разные белки в пределах одного синапса. Разные серотипы имеют разную эффективность и продолжительность действия. Ботулинический токсин типа А является самым мощным и его действие продолжается дольше, чем у других серотипов. Именно серотип А шире всего применяют в терапевтических целях, хотя серотипы В, С и F также используют в клинике и/или в экспериментах. Серотип А приблизительно в 10 раз токсичнее, чем серотип С и примерно в 20 раз токсичнее серотипа В. При использовании для лечения людей эффект ботулинического токсина типа В длится около 6 нед, а серотипа А — приблизительно 4–5 нед.

История изучения ботулинического токсина в качестве ЛС началась с первого подробного описания клинической картины ботулизма (смертельного пищевого отравления) и принадлежит доктору Justinus Kerner из Вюртемберга. На основании проведенных им наблюдений за период с 1817 по 1822 гг. он описал симптомы ботулизма: недомогание, рвоту, диарею, диплопию, мидриаз, неустойчивую походку, затруднённое глотание, а

в терминальных стадиях — нисходящий паралич, бессознательное состояние, сильные судороги, озноб, опистотонус, холодный пот и смертельный исход. При этом J. Kerner предположил, что чрезвычайно малые дозы «колбасного яда» могут быть полезны в лечении гиперкинезов [5].

В 1897 г. бельгийский профессор Emile van Ermengen доказал бактериальную природу ботулизма. Выделенные им микробы — анаэробные спорообразующие бациллы — были названы *Bacillus botulinum* (от лат. *botulus* — колбаса). Позже их назвали *Clostridium botulinum*. В это же время W. Kerner создал первую иммунную сыворотку для лечения ботулизма.

Впервые исследования ботулинического токсина по определению его способности ослаблять тонус мышц животных были проведены в 1973 г. Alan B. Scott. Предварительные данные A. Scott и соавт. по использованию ботулинического токсина типа А в лечении косоглазия были опубликованы в 1980 г. [6]. В 1982 г. A. Scott исследовал влияние ботулинического токсина типа А на нистагм, лицевой гемиспазм, спастическую кривошею и спастические заболевания ног. Эти результаты стали основой для дальнейших исследований применения ботулинического токсина А по другим показаниям.

Впервые препарат ботулинического токсина типа А был одобрен FDA для лечения косоглазия, лицевого гемиспазма и блефароспазма в декабре 1989 г. [7].

Первым утверждённым неврологическим показанием для применения препаратов БТА стала дистония. В настоящее время препараты ботулинического токсина типа А применяются для лечения ряда неврологических синдромов: блефароспазма, спастической кривошеи, дисфонии, тиков, нистагма, лицевого гемиспазма, спастичности, для уменьшения тремора. БТА в качестве ЛС применяется для лечения более 100 патологических состояний, проявляющихся мышечной гиперактивностью, гиперфункцией экзокринных желез и хронической болью.

Препараты ботулинического токсина типа А входят в базисную терапию локальной спастичности при ДЦП в мировой практике уже более 20 лет [8].

Применение БТА при ДЦП

В России препараты ботулинического токсина типа А в педиатрии разрешены к применению с 1999 г.

Препараты БТА при ДЦП **показаны** в следующих случаях:

- 1) спастические (спастическая диплегия, гемипаретическая) формы ДЦП;
- 2) максимум проявления спастичности в одной или двух областях (фокальная или регионарная спастичность);

3) отсутствие фиксированных контрактур суставов;

4) сохранный интеллект или незначительное снижение когнитивных функций;

5) умеренная степень пареза мышцы мишени (снижение мышечной силы не должно превышать 3 баллов);

6) возможность использования функции синергистов и антагонистов для овладения новым локомоторным актом;

7) наличие феномена фокальной или сегментарной дистонии при спастических формах ДЦП.

Противопоказаниями для применения препаратов ботулинического токсина типа А у детей с ДЦП являются:

- атонически-астатическая форма ДЦП;
- наличие фиксированных контрактур;
- генерализованная спастичность, за исключением случаев, когда препарат вводится для улучшения ухода за пациентом;
- изменение структуры мышечного волокна со значительным снижением мышечной активности, наличием выраженного фиброза и атрофии в мышце;
- грубое поражение головного мозга.

Препараты ботулинического токсина типа А разрешены к применению в педиатрии у пациентов с 2 лет, поскольку считается, что именно в этом возрасте явления спастичности становятся наиболее очевидны. Эффективность препаратов БТА зависит от возраста ребёнка (чем младше ребёнок, тем больше эффективность) и от вводимой дозы (чем больше доза, тем больше эффективность) [9].

В России для лечения спастичности при детском церебральном параличе зарегистрированы два препарата БТА: Ботокс (Onabotulinumtoxin A) и Диспорт (Abobotulinumtoxin A), несколько отличающиеся по своему составу.

По данным N.W. A Eams et al. [10], установлено, что введение ботулинического токсина типа А позволяет добиться нескольких основных целей: снижения патологически высокого тонуса мышц; увеличения объёма движения в суставе; нормализации положения стопы при опоре. За счёт вышеперечисленных эффектов достигается улучшение функциональных характеристик ходьбы (скорости, длительности проходимого расстояния, уменьшения энергозатрат на ходьбу) у ребенка, который самостоятельно передвигается. Повышение растяжения расслабленной мышцы обеспечивает её рост в продольном направлении и приводит к снижению вероятности образования и/или уменьшения степени тяжести фиксированной контрактуры в суставе.

Лечение спастичности является целенаправленным и, в первую очередь, определяется таки-

ми клиническими параметрами, как влияние на функции и степень тяжести для каждого ребенка [11]. Основными целями лечения являются максимизация активности, облегчение ухода и предотвращение вторичных симптомов, таких как боль, подвывих и контрактура.

На основании опубликованных результатов исследований и клинического опыта экспертными организациями в мире, в том числе Американской академией неврологии, фонда We Move и Совместных международных заключений (International Consensus Statements) по лечению детей и взрослых с неврологическими нарушениями было разработано руководство для лечения спастичности. В лечебном протоколе и руководстве, выпущенном организацией We Move (церебральный паралич), рекомендуются дозы БТА на мышцу при максимальной общей дозе 16 ЕД/кг массы или 400 ЕД. В рецензии Американской академии неврологии сделано научно обоснованное заключение о том, что ботулинический токсин типа А следует использовать в качестве эффективного и в целом безопасного (уровень А) метода лечения локализованной/сегментарной спастичности верхних и нижних конечностей у детей с ДЦП, требующих лечения, при этом диапазон применяемых доз составляет от 2 до 30 ЕД/кг для различных мышц верхних и нижних конечностей [7].

По данным F. Heinen et al., в Совместном Европейском заключении для препаратов ботулинического токсина типа А указан диапазон от 1 до 20 ЕД/кг при максимальной дозе 50 ЕД в одну зону инъекции и общей максимальной дозе 400 ЕД [12]. Комиссия по болезням верхних конечностей у детей и подростков в рамках Совместного международного заключения рекомендовала диапазон доз для препарата Ботокс от 0,5 до 3 ЕД/кг для разных мышц верхних конечностей, при общей дозе 16 ЕД/кг массы или 400 ЕД на один сеанс. Комиссия по болезням нижних конечностей у детей и подростков в экспертном мнении указала диапазон общей дозы от 16 до 20 ЕД/кг для пациентов, по Классификации общей моторики (GMFCS), относящихся к I–IV уровню, и для пациентов V уровня по GMFCS — от 12 до 16 ЕД/кг.

Оценка эффективности препаратов БТА основывается на клиническом неврологическом осмотре больного, видеодокументировании, применении балльной оценки по различным шкалам и тестам. Неэффективность терапии может быть первичной и вторичной. Первичная неэффективность чаще всего связана с неправильным выбором больного. Другими техническими причинами неэффективности могут стать неправильный выбор мышц-мишеней и неадекватная доза препарата ботулинического токсина. Вторичная неэффективность может быть связана с выработкой антител к ботулиническому токсину типа А. Это

явление нечастое и наблюдается всего в 2–5% случаев. И первичная, и вторичная неэффективность препарата может быть также связана со снижением силы токсина при нарушении условий хранения препарата.

Основные шкалы, применяемые в оценке эффективности терапии ДЦП

В клинической практике используются различные шкалы, тесты и классификации, применяемые для оценки степени моторного дефицита, что необходимо как для динамической оценки состояния больного, так и для оценки эффективности терапии. Одной из широко применяемых при ДЦП функциональных классификаций является «Система классификации глобальных моторных функций» (Gross Motor Function Classification System, GMFCS) и дополняющая ее «Шкала оценки глобальных моторных функций» (Gross Motor Function Measurement System-88 и Gross Motor Function Measurement System-66, GMFMS-88 и GMFMS-66) [13]. GMFCS учитывает степень моторного дефицита, соотношенную с возрастом ребенка. Шкала включает 5-уровневую оценку двигательного развития больного, основанную на оценке самостоятельных движений с акцентом на функцию во время сидения, стояния и ходьбы, при этом учитывая, что у детей двигательные возможности и требования к ним динамически изменяются с возрастом. Шкалы GMFMS-66 и GMFMS-88 позволяют сопоставить оценку двигательного навыка ребенка с возрастной нормой детей с ДЦП, а не здоровой группы. Это даёт возможность получить количественную оценку результатов лечения, сопоставлять данные разных исследователей, что несомненно повышает клиническое и эпидемиологическое значение GMFCS [14].

В то же время нередко необходима оценка отдельных функций, например только моторики верхних конечностей для контроля социальной адаптации и самообслуживания [15]. Для этих целей разработаны специализированные шкалы, в том числе используются: «Система классификации мануальных навыков» (Manual Ability Classification System, MACS); «Шкала оценки вспомогательной функции руки» (Assisting Hand Assessment, AHA); «Шкала оценки качества навыков верхней конечности» (Quality of Upper Extremity Skills Test, QUEST); «Шкала оценки моторного развития Peabody II», подраздел «Оценка тонкой моторики» (Peabody Developmental Motor Scale II); «Педиатрическая шкала ограничения функции» (Pediatric Evaluation of Disability Inventory, PEDI). Однако эти шкалы зачастую не адаптированы для пациентов с ДЦП, некоторые из них требуют специального оборудования либо компьютерных программ, обучения и лицензирования. Наиболее удобны и просты шка-

лы, основанные на оценке игровых функций ребёнка или демонстрации им повседневных бытовых навыков. Среди них шкала Manual Ability Classification System MACS, адаптированная для пациентов с ДЦП в возрасте от 4 до 18 лет [16]. Эта шкала позволяет оценивать функционирование рук у детей с разными формами ДЦП в повседневной жизни [17].

При оценке спастичности также используют ряд специальных шкал. Одной из наиболее распространённых является шкала Эшворта (Ashworth scale). Кроме того, широко применяют модифицированную шкалу Тардье, опросник по оценке степени нетрудоспособности детей инвалидов (PEDI), объём движения (ОД), показатель общей моторики (GMFM), кинетический анализ запястья при указании на объект (КАТ), канадскую шкалу производительности труда (COPM), шкалу тонуса аддукторов, угол разведения нижних конечностей и т.д.

В мировой практике при проведении клинических исследований по изучению эффективности и безопасности применения препаратов ботулинического токсина типа А у детей с ДЦП используются различные шкалы с учётом поставленных целей и задач исследований.

Ретроспективный анализ опубликованных с 1994 г. результатов клинических исследований по препарату Ботокс для лечения спастичности у детей при ДЦП показал, что во всех случаях были выбраны различные первичные и вторичные конечные точки для оценки эффективности, а, следовательно, и различные оценочные шкалы. Так, для оценки спастичности верхних конечностей наиболее часто использовался тест оценки качества двигательных навыков, осуществляемых верхними конечностями (QUEST), а при оценке спастичности нижних конечностей — оценочная шкала врача (ОШВ). Другие способы оценки эффективности включали шкалу Эшворта (AS или MAS), модифицированную шкалу Тардье, опросник по оценке степени нетрудоспособности детей-инвалидов (PEDI), объём движения (ОД), показатель общей моторики (GMFM), кинетический анализ запястья при указании на объект (КАТ), канадскую шкалу производительности труда (COPM) и другие.

При этом в некоторых исследованиях оценка проводилась либо в сравнении с эрготерапией, либо как дополнительная терапия к эрготерапии. В большей части этих исследований были получены статистически достоверные результаты улучшения по выбранным первичным показателям эффективности [18].

В исследовании К. Lowe и соавт. (при сравнении эффективности) препарата Ботокс улучшения отмечались в группе совместного применения его и эрготерапии, по сравнению с эрготерапией в контрольных точках по результатам теста QUEST через 1 и 3 мес, но отсутствова-

ли через 6 мес. В то же время по результатам других шкал, в том числе и по шкале Эшворта, были отмечены статистически значимые улучшения во всех временных точках [19].

В исследовании, проведенном L. A. Speth et al. [20], при оценке эффективности использовалась шкала Эшворта. Несмотря на то, что результаты совместного применения препарата Ботокс и эрготерапии отличались незначительно по сравнению с эффективностью только эрготерапии, были отмечены клинически значимые улучшения активной тыльной флексии запястья на 2-й неделе и снижение тонуса запястья. При сравнении результатов лечения спастичности верхних конечностей препаратом Ботокс и плацебо было отмечено улучшение степени разгибания локтя и большого пальца, снижение тонуса мышц в области запястья и локтя. В исследовании А. Kawamura et al., посвящённом сравнению эффективности высоких и низких доз препарата Ботокс, первичным критерием эффективности была оценка по шкале QUEST через 3 мес, при этом значимые различия между двумя дозами по их воздействию на функцию верхней конечности в течение 3 мес не были получены [21].

Для оценки эффективности применения БТА в некоторых из ранних исследований использовалась Physician's Rating Scale (врачебная рейтинговая шкала), предложенная L. A. Koman et al., в основе которой лежит простая оценка походки [22]. Позднее, в 1998 г., Н. G. Read et al. предложили новую модификацию этой оценки — шкалу Edinburgh Visual Gait Analysis Interval Testing (GAIT) [23].

В последующем для оценки общей двигательной активности стали использовать общую шкалу двигательной активности GMFM, используя её в качестве критерия общей оценки для детей с ДЦП. В нескольких исследованиях — О. J. Flett et al. [24], преимущества инъекций БТА оценивались при использовании Педиатрической шкалы ограничения функции (Paediatric Evaluation of Disability Inventory, PEDI). Эта шкала была предложена N. W. Haley et al. в 1992 г. в Бостоне (США) [25]. PEDI представляет собой стандартизированный тест, разработанный для идентификации и описания функциональных нарушений у детей, и может использоваться в качестве итогового измерения для оценки различных терапевтических программ.

В одном из исследований N. W. Eams et al. [26] в качестве основной оценки эффективности использовали изменение динамической составляющей икроножного сокращения на 4-й нед после инъекции. В дальнейшем для контроля продолжительности действия измерения проводили через 8 и 16 нед. Диапазон пассивного движения в голеностопном суставе, оценивался через 4, 8 и 16 нед, помимо этого применялась оценка по шкале GMFM. При этом измерения динамической со-

ставляющей икроножного сокращения проводили с помощью 3-D анализа походки. В то же время применение 3-D анализа походки, не всегда возможно, поэтому была предложена специальная система измерения, основанная на использовании гибких электрогониометров.

В одном из исследований, проводимых компанией Ипсен по изучению диапазона доз препарата Диспорт у пациентов с динамической конской стопой, связанной с церебральным параличом, оценка эффективности, по данным A. A. Richardson et al., проводилась по степени улучшения контакта стопы с поверхностью, по функциональной оценке походки, а также с помощью Шкалы больших моторных функций (GMFM) [27].

В других аналогичных исследованиях в качестве критерия эффективности была выбрана оценка изменения динамического компонента икроножного сокращения, в том числе по показателю медианы максимального пассивного тыльного сгибания в голеностопном суставе (MPAD).

В исследовании по применению препарата Диспорт, проведенном Baker et al в 2002 г., оценивали эффективность и безопасность трёх доз ботулинического токсина (Dysport®) у 125 больных детей (средний возраст составил 5,2 года, 54% из которых — мальчики) с динамическим эквинусом и спастичностью при ходьбе. Участники были рандомизированы на группы, получавшие Диспорт (10, 20 или 30 ЕД/кг) или плацебо в икроножные мышцы обеих ног. Основным критерием эффективности была длина мышцы, вычисляемая на основе электрогониометрических измерений и изменения динамического компонента — сокращение икроножной мышцы через 4 недели. Все группы лечения показали статистически значимое снижение динамической составляющей по сравнению с плацебо через 4 недели после инъекции [28].

В проспективном, рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании, проведенном Moore et al., с целью оценки многократных циклов лечения Диспортом при спастичности нижней конечности, пациенты получали начальную дозу 15 ЕД/кг, либо плацебо с повышением дозы через каждые 3 мес до 30 ЕД/кг с проведением до 8 циклов лечения при наличии показаний. Эффективность оценивалась по «Шкале оценки инвалидности у детей» и по «Показателю медианы максимального пассивного тыльного сгибания в голеностопном суставе (MPAD)» [29].

В одном из недавних исследований, проводимых группой компаний Ипсен в 2015 г. по изучению эффективности и безопасности применения Диспорта, в том числе у детей с двусторонней спастичностью приводящих мышц на фоне ДЦП, использовалась оценка по шкале MAS (Modified Ashworth Scale, модифицированная шкала Эшворта) и шкала Physician Global Assessment (PGA) [30].

Ещё одна из шкал, используемая в клинических исследованиях, в том числе у детей с ДЦП — GAS (шкала оценки результатов лечения), позволяет оценивать степень достижения поставленной цели в реабилитации. В то же время, по данным D. Steenbeek et al., при анализе специфичности и чувствительности этой шкалы был сделан вывод о том, что она обладает достаточной чувствительностью к изменениям в ходе терапии пациентов с ДЦП. При этом этих данных недостаточно для полной оценки эффективности лечения при анализе реабилитационных мероприятий у детей с ДЦП [31].

Многие шкалы и тесты имеют ряд сложностей и недостатков, так, несмотря на простоту оценки спастичности по шкале Ashworth, в данной методике присутствует определённый субъективизм получаемых данных, что влечёт за собой неполное совпадение баллов при тестировании разными специалистами [32]. Так, согласно исследованию Akmer Mutlu et al., при изучении валидности применения шкалы Эшворта (AS) и модифицированной шкалы Эшворта (MAS) у 38 детей со спастической диплегией при ДЦП [33] показано, что надёжность AS и MAS варьировалась от умеренной до хорошей. Был использован внутригрупповой коэффициент корреляции (ICC) для оценки внутри- и межэкспертной надёжности рейтинговых оценок AS и MAS. Значения ICC были между 0,31 и 0,82 для AS и между 0,36 и 0,83 для MAS. В заключении исследования указано, что данные методики не совершенны, поэтому к интерпретации результатов следует подходить с осторожностью.

В России одной из широко применяемых шкал признана шкала Тардье, основанная на измерении динамического угла в суставе, что может быть применено к большинству суставов и использовано в качестве количественной оценки спастичности [34]. Для измерения динамического компонента производят движение в суставе так быстро, как только возможно на протяжении полного диапазона движения. Угол в суставе, при котором происходит первое «схватывание» мышцы (когда вызывается рефлекс на растяжение), определяется как AV1. Угол полного пассивного движения в суставе определяется как AV2. Разница между углами AV2 и AV1 отражает потенциал движения, возможный для ребёнка. Измерение по шкале Тардье имеет огромное практическое значение в оценке спастичности, так как помогает дифференцировать спастичность и контрактуру; количественно определять степень спастичности; выбирать те мышцы, которые могут ответить на лечение спастичности; мониторировать состояние мышц при лечении спастичности [35].

Другие шкалы, рекомендованные к использованию в оценке эффективности при лечении и реабилитации детей с ДЦП включают: шкалу то-

Оценка величины эффекта при применении препаратов БТА у детей с ДЦП, по результатам клинических исследований

Исследование	Шкала	Исходная величина	Величина эффекта и SD	Effect size (ΔSD) *
[37]	GMFM	БТА 66,5 (SD=23,8) плацебо 69,1 (SD=25,1)	БТА 6, 8 (SD=6,0) плацебо 8,2 (SD=6,3)	0,23
	PEDI scaled score, Self-Care, Functional	БТА 57,2 (SD=11,0) плацебо 55,1 (SD=10,6)	БТА 10,1 (SD=6,9) плацебо 12,6 (SD=6,3)	0,38
	Mobility, Functional	БТА 56,0 (SD=15,9) плацебо 55,2 (SD=15,4)	БТА 8,9 (SD=5,5) плацебо 9,6 (SD=5,2)	0,13
[38]	MAS	БТА 3,133 (SD=0,7) Без терапии 3 (SD=0,53)	БТА 1,6 (SD=0,57) Без терапии 2,73 (SD=0,59)	1,95
[28]	Изменения динамического компонента сокращения икроножной мышцы (электрогонометрические измерения)	БТА 3,4 (SD=1,7) Плацебо 3,4 (SD=1,9)	БТА 1,6 (SD=1,4) Плацебо 3,3 (SD=1,9)	1,02
	GMFM (общая оценка на 4-й нед)	БТА 73 (SD=19) Плацебо 70 (SD=17)	БТА 76 (SD=19) Плацебо 73 (SD=16)	0,17
	GMFM (целевая общая оценка на 4-й нед)	БТА 52 (SD=29) Плацебо 45 (SD=26)	БТА 57 (SD=29) Плацебо 49 (SD=27)	0,29
[39]	QEK (EMG)	БТА 9,92 (SD=10,63) Плацебо 11,20 (SD=9,06)	БТА 4,8 (SD=14) Плацебо 3,2 (SD=8,2)	0,14
	Ashworth scale	БТА 2,50 (SD=64,9) Плацебо 3,0 (SD=82,5)	БТА 5 (SD=3) Плацебо 0 (SD=1,5)	2,11
[40]	Изменения кинематических и кинетических параметров (конечный угол сгибания в коленном суставе)	БТА 26,95 (SD=16,53) Плацебо 19,54 (SD=15,97)	БТА 20,87 (SD=11,20) Плацебо 17,2 (SD=13,20)	0,26
	Максимальный момент разгибания колена	БТА 0,13 (SD=0,05) Плацебо 0,20 (SD=0,11)	БТА 0,18 (SD=0,14) Плацебо 0,20 (SD=0,11)	0,16
[41]	MAS	БТА 2,14 (SD=0,93) Плацебо 2,31 (SD=1,07)	БТА 1,02 (SD=0,18) Плацебо 1,97 (SD=0,62)	1,47
	GMFM	БТА 64,5 (SD=9,76) Плацебо 63,2 (SD=11,45)	БТА 72,7 (SD=10,17) Плацебо 66,1 (SD=11,35)	0,61
[42]	COPM (оценка производительности)	БТА 3,1 (SD=1,3) Плацебо 3,2 (SD=0,7)	БТА 2,3 (SD=1,5) Плацебо 1,2 (SD=1,2)	0,81
	GAS	БТА 2,3 (SD=1,5) Плацебо 1,2 (SD=1,2)	БТА 42,3 (SD=13,7) Плацебо 32,9 (SD=10,3)	0,78

Примечание. Вычисления проводились по следующим формулам $d = M_1 - M_2 / \sigma_{\text{pooled}}$, где $\sigma_{\text{pooled}} = \sqrt{[(\sigma_1^2 + \sigma_2^2) / 2]}$

нуса аддукторов (шкала оценки тонуса приводящих мышц; hamstring-тест, который позволяет количественно определить объём пассивного разгибания в коленном суставе, зависящий от мышечного тонуса задней группы мышц бедра; угол разведения нижних конечностей, который отражает уровень тонуса приводящих мышц.

Находят свое применение и нейрофизиологические методы оценки спастического синдрома, в том числе методы стимуляционной миографии: регистрация М-ответа, Н-рефлекса и F-волны.

Оценка величины эффекта при применении препаратов БТА у детей с ДЦП, по результатам клинических исследований

Нами был проведён анализ ряда клинических исследований с целью выбора наиболее валидированных и достоверных шкал, позволяющих оценить эффективность БТА терапии у детей с ДЦП. Для оценки клинического эффекта по выбранной шкале было рассчитано стандартизованное различие с использованием метода анализа величины

эффекта (Effect Size) [36]. В таблице представлены результаты оценки величины эффекта по результатам отдельных клинических исследований, доступных в литературе последних лет.

Таким образом, в соответствии с полученным результатом анализа величины эффекта, по данным выборки из исследований, опубликованных в иностранной литературе, наиболее чувствительными инструментами для оценки клинического эффекта БТА в лечении синдрома спастичности в исследуемой популяции у детей с ДЦП можно считать шкалу Эшворта и её модификацию.

Следует также отметить, что данные о чувствительности различных шкал, представленные в таблице, могут быть дискуссионными, поскольку анализ проводился на основе отдельных клинических исследований, при этом выборка пациентов в каждом из них имела чёткие критерии включения/невключения, необходимые для конкретного исследования, предусмотренные его дизайном.

Вместе с тем, часто, в зависимости от целей и конкретных задач исследования используются различные шкалы, а иногда комплексные методы анализа эффективности БТА для получения бо-

лее разносторонней оценки, особенно в тех случаях, когда клиническая эффективность применения ЛП неоднозначна.

При оценке эффективности терапии в отечественных детских психо-неврологических ЛПУ у пациентов применяются методы и шкалы, принятые в данном учреждении и/или входящие в национальные, территориальные или локальные стандарты для составления статистических отчетов, а нередко используется их совокупность.

ЛИТЕРАТУРА

- Дутикова Е.М., Лильин Е.Т. Ботулотоксин типа А (Диспорт) в лечении детского церебрального паралича. Фарматека 2007; 7 (142): 37–42. / *Dutikova E.M., Lil'in E.T. Botulotoksin tipa A (Disport) v lechenii detskogo cerebral'nogo paralicha. Farmateka 2007; 7 (142): 37–42. [in Russian]*
- Батышева Т.Т. и др. Лечение спастичности у детей с церебральными параличами. Методические рекомендации №15, М.: 2011. / *Batyshova T.T. i dr. Lechenie spastichnosti u detej s cerebral'nymi paralichami. Metodicheskie rekomendacii №15, M.: 2011. [in Russian]*
- Chambers H.G. Muscle Nerve 1997; Suppl. 6, P. 121129.
- Dressler D., Saberi F.A., Barbosa E.R. Botulinum toxin: mechanisms of action. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63: 180–185.
- Brin M. F., Hallett M., Jankovic J. Scientific and therapeutic aspects of botulinum toxin. NY: Wilkins, 2002; 507.
- Scott A.B. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology* 1980; 87: 1044–1049.
- Delgado M.R., Hirtz D., Aisen M., Ashwal S., Fehlings D.L., McLaughlin J., Morrison L.A., Shrader M.W., Tilton A., Vargus-Adams J. Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. Practice parameter: pharmacologic treatment of spasticity in children and adolescents with cerebral palsy (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2010; 74 (4): 336–343.
- Heinen F., Molenaers G., Fairhurst C. et al. European consensus table 2006 on botulinum toxin for children with cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol* 2006; 10: 5–6: 215–225.
- Miller G., Clark G.D., *The Cerebral Palsies*. Causes, Consequences and Management / Eds G. Miller, G. O. Clark. — Boston: Butterworth Heine-mann, 1998.
- Eams N. W. A., Barker R., Gracham K. et al. The effect of botulinum toxin type A on gastrocnemius length: magnitude and duration of response. *Dev Med Child Neurol* 1999; 41: 226–232.
- Hodgkinson I. Neurosurgical treatment of spasticity: indications in children/ Hodgkinson I., Sindou MM *Neurochirurgie* 2003 May; 49 (2–3 Pt 2): 408–412.
- Heinen F., Desloovere K., Schroeder A.S. et al. The updated European Consensus 2009 on the use of Botulinum toxin for children with cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol* 2010; 14: 1: 45–66.
- Hanna S.E., Bartlett D.J., Rivard L.M., Russell D.J. Reference curves for the Gross Motor Function Measure: Percentiles for clinical description and tracking over time among children with cerebral palsy. *Phys Ther* 2008; 88 (5): 596–607.
- Gorter J.W., Rosenbaum P.L., Hanna S.E., Palisano R.J., Bartlett D.J., Russell D.J., Walter S.D., Raina P., Galuppi B.E., Wood E. Limb distribution, motor impairment, and functional classification of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2004; 46 (7): 461–467.
- Eliasson A.C., Burtner P. Improving hand function in children with cerebral palsy. 1st edn. Mac. Keith Press. 2008.
- Eliasson A.C., Krumlinde-Sundholm L., Rosblad B., Beckung E., Arner M., Ohlqvist A.M., Rosenbaum P. The Manual Ability Classification System (MACS) for children with cerebral palsy: scale development and evidence of validity and reliability. *Dev Med Child Neurol* 2006; 48 (7): 549–554.
- Carnahan K.D., Arner M., Hgglund G. Association between gross motor function (GMFCS) and manual ability (MACS) in children with cerebral palsy. A population-based study of 359 children. *BMC Muscul Dis* 2007; 8: 50.
- Fehlings D., Novak I., Berweck S., Hoare B., Stott N.S., Russo R.N. Botulinum toxin assessment, intervention and follow-up for paediatric upper limb hyper-tonicity: international consensus statement. *Eur J Neurol* 2010; 17 2: 38–56.
- Lowe K., Novak L., Cusich A. Low-dose / high-concentration localized bo-tulinum toxin A improves upper limb movement and function in children with he-miplegic cerebral palsy. *Dev Med Child Neurology* 2006; 48: 170–175.
- Speth L.A., Leffers P., Janssen-Potten Y.J. Botulinum toxin A and upper limb functional skills in hemiparetic cerebral palsy: a randomized trial in children receiving intensive therapy. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 468–473.
- Kawamura A., Campbell K., Lam-Damji S., Fehlings D. A randomized controlled trial comparing botulinum toxin A dosage in the upper extremity of children with spasticity. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49: 331–337.
- Koman L.A., Mooney J.F., Smith B. et al. Management of cerebral palsy with botulinum-A toxin: preliminary investigation. *J Pediatr Orthop* 1993; 4: 489–495.
- Read H.S., Hillmann S.J., Hazlewood M.E. et al. The Edinburgh Visual Gait Analysis Interval Testing (GAIT) scale. *Gait Posture* 1999; 10: 63.
- Flett P.J., Stern L.M., Waddy H. et al. Botulinum toxin A versus fixed cast stretching for dynamic calf tightness in cerebral palsy. *J Paediatr Child Health* 1999; 35: 71–77.
- Haley S., Coster W., Ludlow L., Haltiwanger J., Andrellos P. *Pediatric Evaluation of Disability Inventory (PEDI)*. Boston, Mass: New England Medical Centre Hospitals. 1992.
- Eams N. W. A., Barker R., Gracham K. et al. The effect of botulinum toxin type A on gastrocnemius length: magnitude and duration of response. *Dev Med Child Neurol* 1999; 41: 226–232.
- Richardson A. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to compare the efficacy and safety of Dysport with placebo in lower limb muscle spasticity in patients with spastic cerebral palsy. 2000.
- Baker et al. Dysport in Dynamic Equinus R *Dev Med Child Neurol* 2002; 44: 666–675.
- Moore et al. Two-year placebo-controlled trial of botulinum toxin A for leg spasticity in cerebral palsy. *Neurology* 2008; 71: 122–128.
- Press Release. Ipsen announces topline results of two double-blind phase III studies of Dysport® in lower limb spasticity in children and in adults, 26 January 2015.
- Steenbeek D. et al. Goal attainment scaling in paediatric rehabilitation: a critical review of the literature. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49: 550–556.
- Батышева Т.Т., Гузева В.И., Быкова О.В., Шиошвили В.А., Ногова Е.В., Флорис Л.В. Ахадова Л.Я., Шатилова Н.Н., Квасова О.В., Сметанникова Платонова А.Н. Лечение и реабилитация детей со спастическими формами церебрального паралича. Методические рекомендации № 26. М.: 2016. / *Batyshova T.T., Guzeva V.I., Bykova O.V., Shioshvili V.A., Nogova E.V., Fjoris L.V. Akhadova L.Ja., Shatilova N.N., Kvasova O.V., Smetannikova Platonova A.N. Lechenie i reabilitacija detej so spasticheskimi formami cerebral'nogo paralicha. Metodicheskie rekomendacii № 26. M.: 2016. [in Russian]*
- Mutlu A., Livanelioglu A., Gunel M. K. Reliability of ashworth and modified ashworth scales in children with spastic cerebral palsy. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2008; 9: 44.
- Helders P.J.M., Raoul H., Engelbert H., Custers J.W.H., Gorter J.W., Takken T., Van Der Net J. Creating and being created: the changing panorama of pediatric rehabilitation. *Pediatr Rehabil* 2003; 6: 1 (Jan-Marc 2003): (5–12): 1363–8491.
- Куренков А.Л., Бурсагова Б.И., Кузенкова Л.М., Петрова С.А. Применение ботулинического токсина типа А при спастических формах детского церебрального паралича. Эффективная фармакотер. Педиатрия 2013; 1. / [in Russian]
- Rosnow R.L., Rosenthal R. Computing contrasts, effect sizes, and counternulls on other people's published data: General procedures for research consumers. *Psychol Methods* 1996; 1: 331–340.
- Moore A.P., Ade-Hall R.A., Smith C.T., Rosenbloom L., Walsh H.P.J., Mohamed K., Williamson P.R. Two-year placebo-controlled trial of botulinum toxin A for leg spasticity in cerebral palsy. *Neurology* 2008; 71: 122–128.

38. *El-Maksoud G.M., EL-Sherbini M.H.* Effect of botulinum toxin with rehabilitation therapy on standing in children with spastic diplegic cerebral palsy. *Med J Cairo Univ* 2010; 78: 2: 573—583.
39. *Bjornson K.* Botulinum Toxin for spasticity in children with cerebral palsy: a comprehensive evaluation. *Pediatrics* 2007 Jul; 120 (1): 49—58.
40. *Park E.S. et al.* The effect of botulinum toxin type a injection into the gastrocnemius muscle on sit-to-stand transfer in children with spastic diplegic cerebral palsy. *Clin Rehabil* 2006; 20 (8): 668-674.
41. *Liu J.-J., Ji S.-R., Wu W.-H., Zhang Y., Zeng F.-Y., Li N.-L.* The relief effect of botulinum toxin-a for spastic iliopsoas of cerebral palsy on children, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18 (21): 3223—3228.
42. *Wallen M., O'Flaherty S.J., Waugh M.C.* Functional outcomes of intramuscular botulinum toxin type A and occupational therapy in the upper limbs of children with cerebral palsy: a randomized controlled trial., *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88: 1—10.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Соловьева Анна Петровна — ведущий эксперт ЦЭК ГЛС
ФГБУ «НЦЭСМП», Москва

Фармацевтические субстанции. Требования Государственной фармакопеи к их стандартизации

Е. И. САКАНЯН*, Т. Б. ШЕМЕРЯНКИНА, А. В. БАРМИН, С. А. ЗАЙЦЕВ, Т. А. ЯРУШОК

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

Pharmaceutical Substances. Requirements of the State Pharmacopoeia for Their Standardization

E. I. SAKANYAN, T. B. SHEMERYANKINA, A. V. BARMIN, S. A. ZAITSEV, T. A. YARUSHOK

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow

В настоящей статье рассматриваются современные подходы к стандартизации фармацевтических субстанций синтетического происхождения, реализуемые в виде государственных фармакопейных стандартов лекарственных средств — фармакопейных статей, размещаемых в Государственной фармакопее Российской Федерации. Показатели качества фармацевтических субстанций, методы их определения и нормативные требования к качеству, включённые в фармакопейные статьи, должны быть воспроизводимы для любой субстанции, заявленной под соответствующим наименованием.

Ключевые слова: Государственная фармакопея Российской Федерации, фармацевтические субстанции, стандартизация.

The present article reviews the modern approaches for the standardization of synthetic pharmaceutical substances that are realized in the form of national pharmacopoeial standards — monographs published in State Pharmacopoeia of Russian Federation. The test parameters of pharmaceutical substances, the methods for their determination, and the applicable regulatory requirements involved in the pharmacopoeial monographs should be reproducible for every substance declared under the appropriate name.

Keywords: State Pharmacopoeia of the Russian Federation, pharmaceutical substances, standardization.

Введение

Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», глава 3 [1], предусматривает издание Государственной фармакопеи РФ. Основной задачей фармакопеи является обеспечение качества лекарственных средств путём создания фармакопейных стандартов, предназначенных для их стандартизации и последующего контроля качества на всех этапах жизненного цикла. Монографии/фармакопейные статьи (ФС) на фармацевтические субстанции являются важнейшей составной частью всех фармакопей мира.

Согласно ФЗ № 61 «Об обращении лекарственных средств», фармацевтическая субстанция является лекарственным средством в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, предназначенным для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющим их эффективность.

Этот же закон определяет, что фармакопейная статья — документ, утверждённый уполномочен-

ным федеральным органом исполнительной власти и содержащий перечень показателей качества и методов контроля качества лекарственного средства.

Фармакопейная практика в России началась в XVIII веке с издания первой Российской фармакопеи на латинском языке [2].

В настоящее время на фармацевтическом рынке Российской Федерации находится в обращении около 1000 наименований фармацевтических субстанций химического происхождения (минерального и синтетического) [3]. Вместе с тем, в ГФ РФ XIII издания включено лишь 68 ФС на фармацевтические субстанции [4]. Безусловно, создание ФС в настоящее время представляет собой актуальную задачу, поскольку все фармацевтические субстанции должны быть обеспечены фармакопейными стандартами качества.

ФС являются государственными стандартами, разработанными на основе достоверных научных данных, а также точных аналитических измерений и соответствующих валидационных процедур.

В создаваемый проект ФС включаются как обязательные для всех монографий показатели качества, так и дополнительные, зависящие от природы каждой отдельно взятой субстанции.

К обязательным показателям качества относятся: подлинность, чистота и количественное

© Коллектив авторов, 2017

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

определение с указанием содержания (за исключением субстанций переменного состава).

Показатель качества «Подлинность» используется для подтверждения соответствия вещества заявленному наименованию фармацевтической субстанции.

Как правило, показатель включает несколько испытаний, необходимых для того, чтобы отличить анализируемую субстанцию не только от принципиально иных по структуре соединений, но и от родственных ей.

В настоящее время для контроля подлинности в большинстве случаев, где это применимо, вводится проверка ИК-спектра субстанции, так как этот метод анализа позволяет наиболее точно и достоверно отличить данную субстанцию от любой другой путём сравнения «молекулярного отпечатка» анализируемой фармацевтической субстанции со стандартным образцом.

Другими значимыми испытаниями для подтверждения подлинности являются специфические качественные химические реакции. Если субстанция относится к группе веществ со схожими физико-химическими свойствами, то наряду с качественными реакциями, распространяющимися на всю группу веществ, в ФС приводятся и такие, которые позволяют отличить родственные по структуре субстанции между собой. Например, в ФС на бензилпенициллин натрия и калия, кроме общей качественной реакции на бензилпенициллин, приводятся и различные качественные реакции на натрий и калий, соответственно.

Если для количественного определения или определения родственных примесей используется метод ВЭЖХ, то он также включается в раздел «Подлинность» с требованием совпадения времён удерживания пиков раствора испытуемой субстанции и раствора стандартного образца.

Кроме того, для подтверждения подлинности в ряде случаев применяется метод ТСХ, а также спектрофотометрия в УФ и видимой областях. ТСХ представляет собой достаточно популярный метод в испытаниях подлинности за счёт ряда существенных преимуществ по сравнению с другими методами хроматографического анализа, а именно экспрессности, универсальности, малого расхода фармацевтической субстанции, простоты техники выполнения, наглядности и информативности. Для детектирования необходимого вещества используют реагенты, применяемые в специфических качественных реакциях, или просматривают готовую пластинку в УФ-свете. Метод спектрофотометрии в УФ и видимой областях включается в раздел «Подлинность» как при его использовании в испытании «Количественное определение» (как метод ВЭЖХ), так и при его отсутствии.

Таким образом, вышеперечисленные методы анализа, за исключением специфических ка-

чественных реакций, позволяют наиболее достоверно и однозначно идентифицировать анализируемую субстанцию при сравнении получаемых характеристик вещества с аналогичными характеристиками стандартных образцов (веществ-свидетелей).

Дополнительно подлинность субстанции подтверждается и такими отдельно выделяемыми показателями качества, как «Температура плавления», «Плотность», «Удельное вращение», «Показатель преломления», «Удельный показатель поглощения», «Вязкость» и другими, определяемыми соответствующими каждому из них физическими или оптическими методами.

После подтверждения подлинности фармацевтической субстанции необходима проверка степени её чистоты. Для этого в государственной фармакопее предусмотрено большое количество показателей, которые, как и используемые для их определения методы, можно подразделить на несколько групп.

Одним из наиболее часто включаемых, хотя и неспецифичным показателем уровня содержания примесей, является показатель «Сульфатная зола», в котором определяется сумма минерализуемых неорганических примесей. Среди этих соединений наиболее токсичными являются тяжёлые металлы, поэтому их определение предусмотрено в отдельно выделяемом показателе. При этом устанавливаемые пределы содержания тяжёлых металлов определяются максимальной суточной дозой препаратов, произведенных из данной фармацевтической субстанции, и длительностью их возможного применения.

Наличие неспецифических примесей кислотного или основного характера определяется показателями качества «рН» и «Кислотность или щелочность». Обычно определение рН предусматривается в том случае, если раствор субстанции в воде обладает достаточной буферной ёмкостью, в противном случае, вводится показатель качества «Кислотность или щелочность», при котором определяется количество кислоты или основания, необходимое для изменения окраски индикатора.

К числу наиболее распространённых примесей фармацевтической субстанции относится вода. Её определение важно по двум причинам. Во-первых, без учёта влаги невозможен корректный расчёт количественного содержания субстанции. Во-вторых, наличие в субстанции влаги способствует ускорению процессов её разложения, поэтому содержание воды должно быть нормировано. Соответствующими общими фармакопейными статьями предусмотрено два основных способа определения воды в фармацевтических субстанциях — измерением потери в массе при высушивании и титрованием по методу, предложенному Карлом Фишером. Как правило, в том случае, если молекула

фармацевтической субстанции представляет собой кристаллогидрат, для определения в ней суммы кристаллизационной и адсорбированной воды используются титриметрические методы. Для установления количества адсорбированной влаги в субстанциях, не содержащих кристаллизационную воду, возможны как титрование, так и определение потери в массе при высушивании.

Показатели качества «Прозрачность» и «Цветность» предназначены для того, чтобы с использованием достаточно неспецифических методов обнаруживать примеси различной природы, присутствие которых обнаруживается из-за их влияния на внешний вид раствора субстанции. Оценка этих показателей качества осуществляется, как правило, в случае, если субстанция предназначена для производства препаратов для парентерального применения, глазных капель и других жидких офтальмологических препаратов.

Особенно важно определение родственных примесей фармацевтических субстанций. К родственным примесям относятся сходные по структуре промежуточные соединения, вещества, используемые при получении субстанций, побочные продукты синтеза, а также продукты деструкции субстанции. Стандартизация фармацевтических субстанций по содержанию родственных примесей — один из наиболее важных разделов фармакопейной статьи. Для оценки содержания родственных примесей в большинстве случаев в настоящее время применяют современные методы физико-химического анализа: методы газовой или высокоэффективной жидкостной хроматографии, реже — тонкослойной хроматографии, капиллярного электрофореза и др.

При разработке в фармакопейных статьях требований для родственных примесей учитываются принципы, представленные в руководстве ICH Q3A (R2) «Примеси в новых лекарственных субстанциях» [5], а также в Руководстве по экспертизе лекарственных средств [6].

Число родственных примесей в одной фармацевтической субстанции может иногда достигать нескольких десятков. Например, для субстанции периндоприл, используемой в производстве антигипертензивных препаратов, известны структуры 31 примеси, из которых 6 примесей нормируются отдельно как идентифицируемые. Для применяемой в антипсихотических препаратах субстанции рисперидон описано 12 примесей, из которых содержание нормируется лишь для шести.

В ряде случаев родственные примеси являются чрезвычайно токсичными соединениями. Поэтому их строгое нормирование чрезвычайно важно для обеспечения безопасности фармацевтической субстанции. Например, в обладающей гипогликемическим действием субстанции гликлазид особенно токсичной является примесь В —

2-нитрозооктагидроциклопента[с]пиррол, её содержание нормируется на уровне «не более 2 ppm». В субстанции фенилбутазон наибольшую опасность представляет примесь Е — [1,1'-Бифенил]-4,4'-диамин, бензидин, содержание которой не должно превышать 5 ppm.

Как для идентификации субстанций методом ВЭЖХ, так и при определении родственных примесей обязательно использование стандартных образцов, в том числе фармакопейных стандартных образцов [7]. Согласно Федеральному закону от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств», стандартными образцами являются вещества, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества исследуемых лекарственных средств с помощью физико-химических и биологических методов в целях подтверждения соответствия лекарственных средств требованиям нормативной документации, установленным при осуществлении государственной регистрации, и которые применяются для калибровки стандартных образцов производителя лекарственных средств, используемых для контроля качества и иных целей при обращении лекарственных средств [8].

Существуют различные классификации стандартных образцов. По своему статусу стандартные образцы подразделяются на первичные и вторичные, по природе — на химические, биологические и радиофармацевтические, по назначению — для идентификации, определения чистоты и количественного определения лекарственных средств, а также для калибровки и поверки приборов.

Доступность стандартных образцов во многом определяет уровень стандартизации и последующего контроля качества фармацевтических субстанций, в связи с чем потребность в официальных стандартных образцах достаточно велика. Таким образом, разработка и введение в действие системы государственных стандартных образцов для использования в анализе существующих и вновь разрабатываемых активных фармацевтических субстанций представляет собой актуальную задачу.

Почти во всех фармацевтических субстанциях возможно присутствие примесей побочных неорганических катионов и анионов. Их допустимое содержание также подлежит нормированию. Для определения этого рода примесей в Государственной фармакопее в настоящее время предусмотрены визуальные полуколичественные методы, основанные на качественных реакциях с использованием эталонных растворов, содержащих определённое количество катиона или аниона. Методы определения примесей некоторых из этих ионов подробно описаны в отдельных общих фармакопейных статьях (ОФС): «Алюминий», «Аммоний», «Железо», «Кальций», «Ртуть», «Селен», «Сульфаты», «Фосфаты», «Хлориды», «Цинк» и др.

Помимо химических методов анализа примесей ионов, применение находят и такие методы физико-химического анализа, как атомно-абсорбционная и атомно-эмиссионная спектрометрия, характеризующиеся высокой специфичностью и чувствительностью.

Для контроля микробиологической чистоты или стерильности субстанций предусмотрены такие показатели качества как «Микробиологическая чистота» и «Стерильность». Кроме того, субстанции, используемые в производстве лекарственных препаратов для парентерального применения, дополнительно стандартизируются по показателям «Аномальная токсичность», «Пирогенность» и/или «Бактериальные эндотоксины».

Стандартизации и последующему контролю качества по показателю «Остаточные органические растворители» подлежат все фармацевтические субстанции независимо от способа применения, если при их получении или очистке используются органические растворители. Соответствующей ОФС предусмотрены не только методы определения, но и нормируемое содержание в субстанциях остаточных органических растворителей.

Кроме этого, стандартизация перечисленных фармацевтических субстанций может осуществляться и по другим, более специфичным показателям, например, «Светопоглощающие примеси», «Растворимые соли», «Вещества, нерастворимые в 95% спирте», «Вещества, нерастворимые в кислоте», «Кислотное число», «Перекисное число», «Гидроксильное число», «Нелетучий остаток», «Альдегиды», «Водорастворимые окисляемые вещества» или «Восстанавливающие вещества», «Окисляющие вещества», «Гистамин», «N,N-Диметиланилин», «Легко обугливающиеся вещества», «Мышьяк», «Пероксиды», «Посторонние алкалоиды», «Посторонний запах», «Фурфурол», «Свободная уксусная кислота», «2-Этилгексановая кислота» и др.

Однако важнейшим показателем качества фармацевтической субстанции является содержание в ней основного вещества или фармакологически активной части молекулы, по которому и осуществляется её стандартизация. Диапазон допустимого содержания устанавливается экспериментально. При этом учитываются:

- а) способ получения, определяющий реально возможную степень чистоты субстанции;
- б) точность, правильность и погрешность аналитического метода;
- в) максимально допустимое количество примесей;
- г) скорость разложения субстанции в течение срока годности;
- д) данные количественного определения не менее трёх серий различных производителей.

Если субстанция состоит из двух или нескольких действующих компонентов, количественно нормируется, как правило, каждый из них (например, ментол и ментилизовалерат в валидоле).

Норма содержания приводится в пересчёте на сухое вещество в случае, если предусмотрено определение потери в массе при высушивании, или на безводное, если предусмотрено определение воды по Фишеру.

Методика установления количественного содержания действующего вещества описывается в разделе «Количественное определение». В настоящее время в ФС преобладают три основных способа количественного определения: титриметрия, ВЭЖХ и спектрофотометрия.

Титриметрия предусматривается в ФС, как правило, в тех случаях, когда содержание родственных примесей либо невелико, либо они достаточно полно характеризуются в соответствующем разделе ФС. То же касается и метода спектрофотометрического определения. При возможном значительном содержании в фармацевтической субстанции неидентифицируемых примесей для количественного определения в ФС предпочтительнее отдаётся методу ВЭЖХ, преимущественно со спектрофотометрическим детектированием, сопряжённому с отделением основного компонента субстанции от посторонних.

Большинство показателей качества, включаемых в ФС, предусматривают численное нормирование пределов определённых значений. Помимо них, однако, существуют и условно нормируемые показатели, такие как «Растворимость», «Прозрачность раствора» и «Цветность раствора», для которых требуется подтверждение соответствия субстанции определённым характеристикам.

Эти показатели служат для косвенной проверки как подлинности субстанции, так и её качества, поскольку они могут изменяться при деструкции вещества. Как правило, проверка растворимости предусматривается в двух—четырёх растворителях с различными коэффициентами диэлектрической проницаемости.

Ненормируемые свойства субстанции отражаются в показателе «Описание». В описании субстанции указывается её внешний вид, цвет, кристалличность или аморфность, иногда консистенция. Дополнительно приводятся сведения информационного характера, такие как полиморфизм, гигроскопичность и стабильность в определённых условиях.

Разработка единых норм и предъявляемых требований, то есть стандартизация фармацевтической субстанции, является неотъемлемой частью системы управления её качеством и, следовательно, качеством лекарственных препаратов, производимых из неё.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». / Federal'nyj zakon ot 12.04.2010 № 61-FZ «Ob obrashhenii lekarstvennyh sredstv». [in Russian]
2. Цындимеев А.Г., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Саканян Е.И. Российская фармакопейная практика и перспективы её развития. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, 2016, 2: 4–6. / Cyndymeev A.G., Olefir Ju.V., Merkulov V.A., Sakanjan E.I. Rossijskaja farmakopejnaja praktika i perspektivy ejo razvitiya. Vestniki Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya, 2016, 2: 4–6. [in Russian]
3. Государственный реестр лекарственных средств. Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации. / Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv. Moskva: Ministerstvo zdravooohraneniya Rossijskoj Federacii. [in Russian]
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания. Москва, Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2015. / Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XIII izdaniya. Moskva, Ministerstvo zdravooohraneniya Rossijskoj Federacii; 2015. [in Russian]
5. ICH harmonised tripartite guideline impurities in new drug substances Q3A(R2). / ICH harmonised tripartite guideline impurities in new drug substances Q3A(R2). [in Russian]
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Полиграфплюс, 2014. / Rukovodstvo po jekspertize lekarstvennyh sredstv. M.: Poligraf-pljus, 2014. [in Russian]
7. Меркулов В.А., Саканян Е.И., Климов В.И., Шемерянкина Т.Б., Яшкир В.А., Бармин А.В. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. Химико-фармацевтический журнал, 2015, 11: 54–56. / Merkulov V.A., Sakanjan E.I., Klimov V.I., Shemerjankina T.B., Jashkir V.A., Barmin A.V. Sovremennye podhody k razrabotke standartnyh obrazcov dlja ocenki kachestva farmacevticheskikh substancij. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal, 2015, 11: 54–56. [in Russian]
8. Федеральный закон от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в ФЗ «Об обращении лекарственных средств». / Federal'nyj zakon ot 22.12.2014 № 429-FZ «O vnesenii izmenenij v FZ «Ob obrashhenii lekarstvennyh sredstv». [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Саканян Елена Ивановна — д. фарм. н., профессор, Директор Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (по согласованию), Москва

Шемерянкина Татьяна Борисовна — к. фарм. н., Начальник отдела Государственной фармакопей и фармакопейного анализа, Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (по согласованию), Москва

Бармин Анатолий Вадимович — к. б. н., ведущий научный сотрудник отдела Государственной фармакопей и фарма-

копейного анализа, Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (по согласованию), Москва;

Сергей Анатольевич Зайцев — к. х. н., ведущий научный сотрудник отдела Государственной фармакопей и фармакопейного анализа, Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (по согласованию), Москва

Ярушок Татьяна Александровна — старший научный сотрудник отдела Государственной фармакопей и фармакопейного анализа, Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва

Вторичные метаболиты морских микроорганизмов.

III. Морские грибы — источник биологически активных продуктов

Т. И. ОРЛОВА, В. Г. БУЛГАКОВА, А. Н. ПОЛИН

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Secondary Metabolites from Marine Microorganisms.

III. Marine Fungi — a Source of Bioactive Products

T. I. ORLOVA, V. G. BULGAKOVA, A. N. POLIN

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Настоящая статья представляет собой продолжение ранее опубликованных обзоров, посвящённых биологически активным вторичным метаболитам, синтезируемым морскими микроорганизмами — актиномицетами и грибами. Приводятся данные о структуре грибных метаболитов и их биологической активности. Многие из этих веществ обладают значительной активностью в отношении опухолевых клеток, однако они часто токсичны и в отношении обычных клеток. Предполагается, что определённая химическая модификация этих соединений позволит использовать полученные вещества как эффективные противоопухолевые препараты. Ряд вторичных грибных метаболитов проявляет антибактериальную и анти-вирусную активность, описаны метаболиты, действующие на липидный обмен, на сердечно-сосудистую систему, а также ингибиторы воспалительных процессов и вещества, блокирующие определённые рецепторы.

Ключевые слова: морские грибы, вторичные метаболиты, химическая структура, биологическая активность, цитотоксичность, опухолевые клетки.

Marine-derived fungi are a rich source of structurally diverse bioactive secondary metabolites which might be useful for drug design. Up to date, a lot of structurally and pharmacologically novel and interesting bioactive secondary metabolites have been isolated from marine-derived fungi. Some of them have high toxicity toward cancer cells, however they are also cytotoxic to normal cells. These compounds require structural modifications to decrease the toxicity and increase the antitumor activity. A large number of substances have antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and immunomodulatory activities.

Keywords: marine fungi, bioactive secondary metabolites, chemical structure, cytotoxic activity, cancer cell lines.

Долгое время микроскопические грибы считались сухопутными микроорганизмами. Затем эти представления стали пересматриваться: грибы достаточно широко распространены в морях. Сначала внимание было сосредоточено на облигатных морских видах, способных расти и спорулировать исключительно в морских условиях. Однако оказалось, что многие грибы, живущие в море, известны также как сухопутные и скорее могут быть отнесены к категории факультативных. Возможно, большое значение имеет способность грибов адаптироваться к новым условиям, а также многосторонность и лабильность экосистем [1]. Переходя в новые места и условия обитания, грибы стали образовывать в дополнение к известным метаболитам новые продукты, часто с новой биологической активностью.

Виды *Penicillium* и *Aspergillus* — типичные сухопутные микроорганизмы широко распростра-

нены в морях. Различные виды морских пенициллов синтезируют множество активных веществ, поэтому в данном обзоре отражены только наиболее существенные метаболиты, описанные за период 2007—2015/2016 гг.

Полагают, что ресурс морских грибов как источника новых продуцентов недооценен [2]. Наибольший интерес представляют редко изолирующиеся грибы как возможные продуценты новых биологически активных продуктов. Дополнительным источником морских грибов и, соответственно, новых полезных природных продуктов являются мангровые зоны океана.

Грибы рода *Penicillium* часто встречаются среди морских микроорганизмов, в том числе в экстремальных условиях обитания — большие глубины, гидротермальные источники, места экологически неблагоприятные. Пенициллы часто образуют уже известные однотипные соединения, а также несколько новых метаболитов, возможно, продуктов «активированных» генов [1–3].

P. pinophilum SD-272 был выделен из отложений в устье Жемчужной реки (Южно-Китайское

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

море). Из культуральной жидкости получены — новый дикетопиперазин пинодикетопиперазин А и новое производное фталевой кислоты 6,7-дигидрокси-3-метокси-3-метилфталид. Соединения токсичны [4].

Из морского изолята *P. bilail* (Тасмания) выделены известные ароматические поликетиды цитромицин и цитромицетин, их дигидропроизводные, а также известные дикетопиперазины, в структуре которых белковые аминокислоты. Микроорганизм образует также три новых дикетопиперазина — билейны А-С. Билейн С образован N-метиламинокислотами и метилтиозаместителями. Несколько соединений слабо цитотоксичны [5].

Penicillium sp. JMF034, выделенный из глубоководных осадков, образует два новых метаболита — бис(детео)-10а-метилтио-3а-деокси-3,3а-дидегидро глиотоксин и 6-деокси-5а,6-дидегидроглиотоксин. В структуре этих соединений содержатся элементы тиодикетопиперазинов. Одновременно синтезируются и известные метаболиты. Все соединения цитотоксичны. Метаболиты, содержащие дисульфидную связь, являются ингибиторами гистонметилтрансферазы G9a [6].

Выделенный из морских осадков *P. chrysogenum* PJX-17 синтезирует два новых сорбициллиноида, фрагментами которых являются бицикло [2.2.2.]октан и 2-метоксифенол. Вещества обозначены как сорбикатехолы А и В. Одновременно образуются известные протокатехоловая кислота и кофеиновая кислота в виде метиловых эфиров. Сорбикатехолы А и В активны против вируса А(Н1N1) с IC_{50} 85 и 113 мкМ, соответственно [7].

Penicillium spp. F23-2, выделенный из глубоководных осадков, при аэрационной ферментации синтезирует пять азотсодержащих сорбициллиноидов — сорбицилламины, например, бисвертинолон. При ферментации в статических условиях образуются индольные алкалоиды и терпеноиды — мелигрины, роквифортины, конитиогеноны. Новые сорбицилламины проявляют цитотоксичность [8]. Тот же микроорганизм при культивировании на рисовой среде образует пять новых аналогов амбаевой кислоты — пенициклоны А-Е, активные против грамположительных бактерий с МПК₅₀ в интервале 0,3—1,0 мкМ [9].

При скрининге новых эффективных антиоксидантов было обнаружено, что выделенный из морской губки *P. citrinum* I1080624G1f01 синтезирует новое производное сорбициллиноида — JBIR-124, обладающее антиоксидантной активностью [10].

Другой выделенный из губки штамм *P. citrinum* образует четыре сесквитерпеноидных метаболита — JBIR-27, петасол, спороген АО-1 и дигидроспороген АО-1. Спороген АО-1 обладает слабой антимикробной и цитотоксической активностью,

дигидроспороген АО-1 ингибирует клетки карциномы Эрлиха с IC_{50} 0,4 мМ [11].

Морской изолят *P. citrinum* синтезирует дицитринон В — редкий пример димера, образованного углеродным мостиком. Вещество эффективно подавляет пролиферацию раковых клеток различных типов, в том числе клеток меланомы человека А375. Дицитринон В индуцирует апоптоз клеток, вызывая накопление активного кислорода и снижая митохондриальный мембранный потенциал клеток, и обнаруживает более высокую противоопухолевую активность, чем 5-фторурацил [12].

Новое семейство активных метаболитов выделено из морского штамма *Penicillium* sp., обитающего в донных отложениях Тихого океана на глубине 5115 м. Среди выделенных соединений стероловая кислота и три неизвестных ранее бревбиона, представляющих собой спиродитерпеноиды. Цитотоксичность проявляют варианты соединений, у которых при С-11 имеется гидроксильная группа. Варианты, у которых в этом положении находится кетонная группа, цитотоксичностью не обладают [13].

Из *P. janthinellum* Biourge выделены три новых индольных алкалоида — шиарины D, E и F и один известный. Соединения вызывают апоптоз клеток лейкемии человека HL-60. Один из новых шиаринов ингибирует индуцированную злокачественную трансформацию клеток JB6P [14].

Penicillium spp. F00120, выделенный из отложений на глубине 1300 м, образует хинон-сесквитерпен пенициллиумин А, который проявляет цитотоксическую активность против меланомы мыши В16, меланомы человека А375, линии клеток карциномы человека HeLa [15].

Из морского штамма *Penicillium* sp. F446 выделены пенициллипилены А и В. Этот новый класс интересен уникальной связью между сесквитерпеном и γ -пироном. Вещества индуцируют хинон-редуктазу [16].

Морской штамм *P. concentricum* ZLQ-69 синтезирует два новых фенилпиропена Е и F и семь известных фенилпиропенов и пирипиропенов. Фенилпиропен Е и один из известных фенилпиропенов цитотоксичны по отношению к линии клеток MGC-803 с IC_{50} 19,1 и 13,6 мкМ, соответственно [17].

P. thomii КММ 4645 и *P. lividum* КММ 4663, выделенные из водоросли, синтезировали на рисовой среде семь саргассопениллинов А-Г. Компоненты А и В — новые члены этой группы соединений, содержат ароматический цикл, присоединенный к спирокетальной части молекулы, что является редкостью в природных соединениях. Соединение С ингибирует транскрипционную активность онкогенного ядерного фактора AP-1 [18].

Те же микроорганизмы, но на другой среде образуют десять полициклических аусталидов,

которые отнесены к классу меротерпеноидов. Четыре из них подавляют AP-1-зависимую транскрипционную активность линии клеток JB6 C14 в нецитотоксических концентрациях. Ряд аусталидов ингибирует 1,3- β -D-глюканазу из кристаллического «стебелька» морского моллюска [19,20].

P.panenum SD-44, выделенный из морских отложений, синтезирует достаточно редкие для морских грибов химические структуры: триазолкарбоновую кислоту (пенпаноид А) и хиназолиновый алкалоид, в структуру которого входит дигидроимидазольный цикл [21]. Тот же штамм образует пять новых производных антраниловой кислоты — пенипациды А-Е. Соединения А и Е цитотоксичны в отношении раковых клеток прямой кишки линии RKO [22].

Penicillium sp. из коричневой водоросли (Новая Зеландия) при ферментации на декстрозо-томатной среде синтезирует два новых 2-пиридона и три известных алкалоида, содержащих N-гидроксид-2-пиридон [23].

P.commune QSD-17 из отложений Южно-Китайского моря образует шесть новых производных азафилонов — комазафилоны. Некоторые вещества активны против нескольких видов бактерий, другие цитотоксичны в отношении линии клеток панкреатического рака человека SW1990 [24].

P.copticola, выделенный из района острова Окинава, синтезирует метаболит, ингибирующий рост *Mucor hiemalis*. Метаболит имеет структуру полисукцинамида и назван пенициллимид. Одновременно образуются пять известных сесквитерпенов [25].

Штамм *P.expansum* Y32, выделен из образцов воды Индийского океана, взятых с глубины 30 м. При скрининге на метаболиты, воздействующие на сердечно-сосудистую систему, проводившемся с использованием рыбы-зебры в качестве модели, получено три новых алкалоида и девять известных аналогов. Все соединения обнаруживают значительный кардиоваскулярный эффект [26].

Морской гриб *P.steckii* 108YD142 синтезирует новое обладающее противовоспалительной активностью производное танзаваевой кислоты (ТК) — ТК Q и четыре её известных аналога. Все соединения ингибируют образование окиси азота NO, а ТК Q подавляет индуцируемую липополисахаридом NO-синтазу и циклооксигеназу-2, а также уменьшает экспрессию мРНК в макрофагах RAW-264-7 [27].

Грибы рода *Aspergillus* широко распространены в природе, а также среди микроорганизмов, выделяемых из морских источников. Они занимают значительное место как по количеству синтезируемых ими новых метаболитов, так и по разнообразию проявляемой этими метаболитами биологической активности. Выявлены такие особенности аспергиллов, как склонность к росту на

плотных средах, росту в статических условиях без аэрации, а также зависимость состава синтезируемых продуктов от состава среды.

Новые лумазин-содержащие пептиды терре-лумамиды А и В образуются морским штаммом *A.terreus*. Метаболиты представляют собой линейные ансамбли, состоящие из 1-метил-лумазин-6-карбоновой кислоты, остатка аминокислоты и метилового эфира антраниловой кислоты, объединённых пептидными связями. Фармакологическим свойством этих пептидов является повышение ими чувствительности к инсулину. Кроме того, при связывании с ДНК пептиды изменяют флуоресценцию, что даёт потенциальную возможность их использования для распознавания последовательностей ДНК в тканях [28].

Четыре новых циклопептида — психрофилины с редкой амидной связью между карбоновой и антраниловой кислотами и азотом индольного фрагмента синтезируются морским грибом *A.versicolor* ZLN-60. Одновременно образуется новый гексапептид версикотид. Один из психрофилинов обладает мощным гипوليцидемическим эффектом [29].

Австралийский штамм морского гриба *A.versicolor* синтезирует два новых циклопентапептида коттеслозины А и В и алкалоид коттохиназолин. Вещества А и В — слабые цитостатики [30].

Aspergillus sp. fS14, выделенный из морской губки (префектура Окинава), образует два новых дикетопиперазина. В состав соединений входят имидазоламинокислота и валин или изолейцин [30]. Этими же авторами выделен из водоросли, обитающей в том же регионе, штамм *Aspergillus* sp. SpDo81030G1f1, синтезирующий дипептиды JBIR-81 и SBIR-83, новые аналоги терпептина. N-концевые группы дипептидов ацилированы ацильным остатком, C-концевые — индольным хромофором. Соединения не проявляют цитотоксичности или антибактериальной активности, но обладают защитным действием в отношении свободных радикалов [32].

Выделенный из морской губки штамм *A.similansis* KUFA 0013 синтезирует новый циклогексапептид симиланамид, новое изокумариновое производное симиланпирон и новое пирипириновое производное. Симиланамид обладает слабой активностью против трех линий раковых клеток [33]. Отмечена тенденция к синтезу морскими грибами циклопептидов, включающих такие аминокислоты, как антраниловая, пипеколинная и имидазоламинокислота.

Морской изолят *A.sydovi* PFW1-13 образует три новых дикетопиперазиновых алкалоида: 6-метоксиспиротрипростатин, 18-оксотрипростатин и 14-гидрокситерезин, проявляющих слабую цитотоксическую активность против линий клеток A-549, а также два нордаммаран-

тритерпеноида, проявляющих антибактериальную активность [34].

Морские штаммы *Aspergillus* SF74 и *Aspergillus* SF76 образуют дигидроизокумариновое производное (1) и двенадцать известных метаболитов того же типа. Изучали *in vitro* противовоспалительное действие 1 и других производных с использованием стимулированных липополисахаридом микроглиальных клеток. Вещества ингибируют образование окиси азота и простагландина E_2 , подавляя индуцибельные синтазу NO и циклооксигеназу-2. Вещество 1 ингибирует фосфорилирование ядерного фактора каппа B- α [35].

Штамм *A.wentii*, выделенный из коричневой водоросли, при культивировании в присутствии анилинового производного гидроксамовой кислоты, добавленного для пробуждения «молчащих генов», синтезирует два новых ароматических нордистерпена — аспевентины A и B и окисленный аспевентин C. Аспевентины A-C проявляют значительную активность против некоторых морских организмов [36].

A.wentii EN-48, также выделенный из коричневой водоросли, образует асперолиды A-C — тетранорабдан-терпеноиды и пять родственных производных [37].

Aspergillus sp. 05F-16 выделен из водоросли, растущей в коралловых рифах Индонезии. Штамм синтезирует два новых гексагидроантрона: тетрагидробострицин и 1-деокситетрагидробострицин. Вещества обладают слабой антибактериальной активностью [38].

Штамм *A.ochraceus* EN-31 из коричневой водоросли образует стероиды, среди которых редкий 7-норстероид с необычной системой пенталактон-B-цикла и два новых стероидных производных, а также девять известных близких по структуре стероидов. Новые вещества обнаруживают цитотоксическую активность [39].

В экстракте из морского гриба *A.ustus* 094102 обнаружено восемь новых дримансесквитерпенов и шесть изохромансесквитерпенов, а также три известных соединения. Из изохромановых производных одно обладает высокой цитотоксичностью в отношении линии клеток HL60 — IC_{50} 0,13 мкМ, два дримансесквитерпена обнаруживают умеренную цитотоксичность против линий A549 и HL60 [40]. Другой штамм этого гриба, выделенный из губки, образует семь новых дримансесквитерпенов, представляющих собой сопряженные углеводные цепи, содержащие карбоксильную, альдегидную, кетонную и гидроксильную группы. Четыре соединения проявляют цитотоксическую активность против линий раковых клеток L5178Y, HeLa и PC12. IC_{50} вещества, наиболее активного в отношении клеток L5178Y, 0,6 мкг/мл [41].

Выделенный из морской губки штамм *A.insuetus* синтезирует новые терпеноиды терретонины

Е и F. Эти вещества, а также ранее известный аурантиамин являются ингибиторами митохондриальной дыхательной цепи [42].

A.candidus IF10, выделенный из морских осадков у берегов Японии с глубины 50 м, образует три новых цитотоксичных метаболита пренилтерфениллин, 4"-дезоксипренилтерфениллин и 4"-дезоксиизотерпренин. Вещества активны против клеток эпидермоидной карциномы человека с IC_{50} 8,5, 3,0 и 2,6 мкг/мл, соответственно [43].

Четыре новых пренилированных дифениловых эфира (диорцинолы B-E) получены из культуральной жидкости *A.versicolor* ZLN-60, выделенного из губки. Два соединения обладают умеренной цитотоксической активностью против клеточных линий HeLa [44].

Выделенный из губки Южно-Китайского моря штамм *Aspergillus* sp. синтезирует четыре новых сесквитерпеноида типа бисаболана. Вещества проявляют селективную антибактериальную активность с МПК 1,25—20,0 мкМ [45].

Штамм *A.versicolor* HDN 1009, выделенный из мангровых зарослей, синтезирует шесть необычных ксантон-хроманон димеров, версиксантоны, которые образованы связями между мономерами тетрагидроксантаона и 2,2-дизамещённого хроман-4-она. Соединения цитотоксичны в отношении семи линий раковых клеток с наименьшей величиной IC_{50} 0,7 мкМ. Одно из соединений ингибирует топоизомеразу I [46].

Эндофитный гриб *A.niger* EN-13, выделенный из коричневой морской водоросли, образует новые мономерные и димерные нафто- γ -пироны нигераспиры А-С. Вещества не обнаруживают заметной цитотоксичности. Одно из соединений проявляет слабую активность против *Candida albicans*. Предполагается, что отсутствие биологической активности связано с тем, что в структуре веществ отсутствует хинонная группировка [47].

Выделенный из донных отложений штамм *A.carbonarius* WZ-4-11 синтезирует карбонароны А и В — производные γ -пирона и α -пиридона. Вещества умеренно токсичны в отношении линий клеток K562 [48].

Два новых аспохалазина V и W были обнаружены в культуральной жидкости *Aspergillus* sp., выделенного из кишечника морского ракообразного. Вещества представляют собой впервые описанные метилтио-замещённые производные аспохалазина. Соединение V проявляет умеренную цитотоксичность против линии клеток рака простаты PC3 и линии клеток HCT116 [49].

Морской гриб *Aspergillus* sp. SCSIO F063 при культивировании на картофельной среде с добавлением морской соли образует семь новых галогенированных антрахинонов, близких к аверантину, и пять известных ранее аналогов. В присутствии в среде бромида натрия образуются

еще два новых бромированных антрахинона. Метаболит 6-0-метил-7-хлораверантин активен против трёх линий опухолевых клеток человека — SF-268, MCF-7 и NCI-H460 с IC_{50} 7,11, 6,64, 7,42 мкМ, соответственно [50].

Восемь новых ароматических поликетидов, а также восемь известных аналогов выделено из морского гриба *A.glaucus*, ряд соединений проявляет активность в отношении клеточных линий A-549 и HL-60 с IC_{50} 0,24 и 0,51 мкМ, соответственно [51].

Из морского изолята *Aspergillus* sp. выделено полиоксигенированное производное декалина и ранее описанные фузариелины А и В. Все вещества обладают умеренной антибактериальной активностью против *S.aureus* — метициллиноустойчивых и с множественной лекарственной устойчивостью (МПК 32,5—62,5 мкг/мл) [52].

A.aculeatus CRI323-04 синтезирует новое производное тирозина аспергилласол, а также оксим пировиноградной кислоты и секалоновую кислоту. Аспергилласол селективно ингибирует α -глюкозидазу дрожжей, но не бактерий [53].

Далее представлены данные о новых вторичных метаболитах, синтезируемых морскими грибами, выделенными в период 2007—2015/2016 гг. и отнесёнными к «редко встречающимся». При выделении продуцентов из природных объектов грибы некоторых родов встречались не более одного раза. Характер обнаруженных новых активных продуктов, образуемых этими грибами, в значительной мере зависит от поставленной задачи, от метода скрининга с ориентацией на биологические свойства искомого метаболита.

Из культуральной жидкости морского гриба *Graphium* sp. OPMF00224 выделено восемь тиодикетопиперазинов — графимиумов, а также два известных дикетопиперазина. Пять графимиумов ингибируют рост метициллиноустойчивых *S.aureus*. Устойчивые стафилококки образуют жёлтый пигмент стафилоксантин, локализуемый в мембране и препятствующий проникновению антибиотика в клетку. Графимиумы подавляют синтез стафилоксантина и устраняют антибиотикоустойчивость [54].

Сульфолкилрезорцинол, новый продукт выделенного из коралла морского гриба *Zygosporium* sp. KNC52, получен при культивировании микроорганизма на агаризованной среде. Вещество подавляет ГТФ-азную активность FtsZ (структурный гомолог тубулина) и FtsZ-полимеризацию, нарушая процесс клеточного деления. Соединение проявляет слабую антимикробную активность против микобактерий и стафилококков с множественной устойчивостью [55].

Гриб *Cadophora malorum*, выделенный из зелёной морской водоросли, на среде с морской солью синтезирует новые гидроксिलированные

производные склероспорина. Одно из веществ обладает слабо выраженной способностью ингибировать накопление липидов в 3T3-L адипоцитах мышей [56].

Панктапоронины Н-М — новые сесквитерпеноиды типа кариофиллена синтезируются грибом *Hansfordia sinuosae*, выделенным из губки. Вещества являются уникальными природными продуктами, характеризующимися присутствием в скелете структуры бицикло[2.7.0]ундекана и способностью к перегруппировкам. Соединение К эффективно снижает содержание триглицеридов и общего холестерина на внутриклеточном уровне и может представлять интерес для создания лекарств, понижающих уровень липидов [57].

Гриб *Clonostachys rosea* из донных отложений в устье Луары культивировали на шести средах для повышения продукции липидов. Была выделена редкая ненасыщенная конъюгированная разветвлённая жирная кислота в виде триглицерида, составляющая 23% от общего содержания жирных кислот. Соединение идентифицировано как 4-метил-6Е,8Е-гексадекадиеновая кислота. Вещество снижает выживаемость раковых клеток дыхательных органов линии MCF-7 и уменьшает экспрессию генов двух липогенных ферментов — ацетил-СоА-карбоксилазы и синтазы жирных кислот [58].

Хромоны — большая группа природных соединений, характерным элементом структуры которых является бензо- γ -пирон. Многочисленные варианты заместителей в основной структуре создают разнообразие этих соединений. Хромоны синтезируются многими морскими грибами.

Двенадцать новых производных хромона — коринехромоны А-Л выделены из культуральной жидкости гриба *Corynespora cassicola* XS-20090017, полученного из морской губки. Среди выделенных соединений восемь были парами эпимеров [59].

Восемь новых хромонов — энгиодонтиумоны А-Н, восемь новых фенольных производных и восемь известных поликетидов синтезируются глубоководным грибом *Engyodontium album* DFF-SCS021, выделенным из морских осадков в Южно-Китайском море. Два новых соединения обнаружили значительную селективную активность против клеток лимфомы человека линии U937 с IC_{50} 4,9 и 8,8 мкМ. Одно из соединений проявило высокую активность в отношении личинок *Balanus amphitrite* — IC_{50} 19,1 мкг/мл [60].

Продуцент новых редких хромонов получен при воздействии мутагена на морской штамм *Penicillium purpurogenum* G59. Мутант синтезировал эпиремиспорин В, эпиремиспорин В1 и изокониохетон и три известных хромона. Все соединения в той или иной степени цитотоксичны в отношении семи клеточных линий рака человека [61].

Монодиктиохромы А и В — новые димерные хромоны, образованные из двух уникально модифицированных ксантоновых единиц, синтезируются морским грибом *Monodictys putredinis*. Вещества ингибируют активность цитохрома P450 1A с IC_{50} 5,3 и 7,5 мкМ, соответственно, и проявляют умеренную активность как индукторы НАД(Ф)Н хинонредуктазы в культурах клеток Нера c1c7 мыши [62].

Ксантоны — многочисленное семейство природных соединений, основу скелета которых составляет дибензо- γ -пирон. Разнообразие ксантонов достигается за счёт модификаций и заместителей в бензольной части молекулы.

Морской гриб *Phomopsis* sp. HNY29-2B, выделенный из мангровых зарослей, образует три новых фомоксантона — фомолактонксантоны А и В и деацетилфомоксантон наряду с пятью известными фомоксантонами. Вещества обладают цитотоксичностью в отношении некоторых линий раковых клеток [63].

Новые природные продукты хетоксантоны А, В и С получены при культивировании морского гриба *Chaetomium* sp. В структуре веществ А и В содержатся гетероциклические заместители диоксан и тетрагидрофуран, редко обнаруживающиеся в природных продуктах. Вещество В селективно активно против *Plasmodium falciparum* с IC_{50} 0,5 мкг/мл и не проявляет токсичности против эукариотических клеток. Соединение С — хлорированный ксантон и тетрагидрофуран в качестве заместителя. Вещество умеренно активно против *Trypanosoma cruci* — IC_{50} 1,5 мкг/мл [64].

Многие роды морских грибов синтезируют аминокислотные метаболиты — пептиды, циклопептиды, депсипептиды липопептиды и др. с различной биологической активностью.

Морской гриб *Alternaria* sp. SF-5016 образует циклодепсипентапептид алтернарамид, в состав которого входят два остатка D-фенилаланина, два остатка L-пролина остаток β -гидроксиалифатической кислоты. Вещество проявляет слабую антибиотическую активность [65].

Два новых циклодепсипептида скопулариды А и В синтезируются выделенным из губки грибом *Scopulariopsis brevicaulis*. Структура компонента А: цикло-(3-гидрокси-4-метилдеcanoил-Gly-L-Val-D-Leu-L-Ala-L-Phe), компонента В: цикло-(3-гидрокси-4-метилоктаноил-Gly-L-Val-D-Leu-L-Ala-L-Phe). Вещества обладают слабой антибактериальной активностью, но эффективны против ряда раковых клеточных линий в концентрации 10 мкг/мл [66].

Из штамма морского гриба *Tolypocladium* sp. AMB18 выделен новый понижающий регулятор молекулярного шаперона GRP78 эфрапептин J. Вещество — линейный пентадекапептид, содержащий гексагидропирроло [1,2- α]пиримидино-

вую часть. Эфрапептин J ингибирует экспрессию белка шаперона GRP78 в клетках HT1080 и в клетках рака желудка человека MKN74 [67].

При культивировании выделенного с поверхности морской губки гриба *Exophiala* sp. были получены новые производные аспирина хлоргидроаспиры А и В, а также ранее известные аспирон, асперлактон и пеницилловая кислота. Новые метаболиты обнаруживают слабую антибактериальную активность против стафилококков с множественной устойчивостью и метициллиноустойчивых [68]. Тот же гриб синтезирует новый бензодиазепиновый алкалоид циркумдатин и два известных циркумдатина. Соединения обладают значительной УФ-защитной активностью [69].

Из средиземноморской губки выделен штамм гриба *Bartalinia robillardoides* LF550. Впервые показана способность гриба этого рода синтезировать хлоразафилоны — получены три новых метаболита, идентифицированные как хеликузин Е и изохромофилоны Х и XI. а также два ранее описанных хлоразафилона. Азафилоны — флуоресцирующие красители и могут быть использованы для наблюдения в реальном времени за состоянием живых клеток и органелл [70].

Два новых производных фурана — гипофураны А и В и три новых циклопентенона — гипокреноны А-С, а также ряд известных соединений были получены при культивировании гриба *Hypocrea koningii* PF04, выделенного из морской губки. Ряд соединений показал умеренную активность против *S.aureus* и способность снижать уровень свободных радикалов [71].

Морской гриб *Dichotomomyces cejpaii* синтезирует два новых индолодитерпена — эминдол SB β -маннозид — антагонист рецептора CB₂ и 27-О-метиласпоризин — селективный антагонист рецептора GPR-18. Новые индольные природные производные могут быть использованы как образец структуры для создания блокирующих рецепторы препаратов [72].

Из культуры того же гриба выделено новое глиотоксиновое производное 6-ацетилмонодетиоглиотоксин и метилтиоглиотоксиновые производные, ранее известные лишь как полусинтетические соединения. Вещества обнаруживают способность к понижающей регуляции индуцированного ядерного фактора каппаВ (NF- κ B) в клетках хронической миелоидной лейкемии человека. Изучение нового соединения показывает потенциальную возможность использования эпимонотиодикетопиперазиновых производных как ингибиторов NF- κ B [73].

Эндофитный морской гриб *Coniothyrium cereale* образует алкалоиды поликетидного типа с необычной структурой: (-)-цереолактан и (-)-цереоалдомин, содержащие лактам и имин, соответственно. Вещества селективно ингибируют

эластазу лейкоцитов человека с IC_{50} 9,28 и 3,01 мкМ. Родственный метаболит (-)-трипетелон активен против микобактерий, *E.coli* и стафилококка, а также проявляет цитотоксичность в отношении фибробластов мыши [74].

Из экстракта гриба *Daldinia eschscholzii*, выделенного из морских источников, получено пять новых соединений: рибогликозид бензопирана далдинисид А, два рибогликозида изокумарина далдинисиды В и С и два алкалоида. Биологической активности у соединений не обнаружено [75].

Выделенный из губки гриб *Arthrimum arundinis* ZSDS1-F3 синтезирует три новых 4-гидрокси-2-пиридон алкалоида — артпироны А-С. Вещества А и В содержат оксабицикло [3.3.1]нонан, циклическую систему, редко встречающуюся в природе [76].

Морской гриб *Nigrospora* sp. PSU-F5 образует нигроспоксидоны А-С, нигроспорапирон, а также девять известных соединений [77].

Выделенный из морской звезды гриб *Pseudallescheria boydii* синтезирует два новых изобензофуранона — псевдабойдины А и В и пять известных производных изобензофурана. Соединение А проявляет умеренную цитотоксичность в отношении клеточных линий карцином человека HONE1, SUNE1 и GLC82 [78].

Выделенный с поверхности красной водоросли гриб *Microsporium* sp. синтезирует антрахиноновое производное фисцион (I). Вещество цитотоксично в отношении клеток HeLa карциномы шейки матки. Показано, что индукция апоптоза клеток HeLa, вызываемая I, связана с понижающей регуляцией экспрессии Bcl-2, повышающей регуляцией экспрессии Bax и активацией каспазы-3. Кроме того, I индуцирует образование в клетках HeLa активных форм кислорода. Предполагается, что I может быть использован как противоопухолевый препарат [79].

Штамм *Phialocephala* sp. FL30r, полученный в результате скрининга на клеточную линию K562, был выделен из морских осадков с глубины 5053 м. Гриб образует два новых бисорбициллиноида оксосорбихинол и дигидроорксосорбихинол, являющихся димерами сорбициллинов.

Димеризация осуществляется путём связи между гексациклическим кольцом одной молекулы и сорбильной боковой цепью второй. Тип образования димеров является редким случаем димеризации в данном классе соединений. Полученные вещества цитотоксичны против четырёх линий раковых клеток — P388, HL60, BEL7402 и K562 [80].

Морской гриб *Paraconiothyrium* sp., синтезирующий эпоксифомалины А и В с высокой цитотоксичностью, также образует три новых соединения. Вещества являются модификацией эпоксифомалинов А и В и образуются в результате окисления циклогексеновой или декалиновой

частей молекул этих соединений. Все вещества цитотоксичны, одно из новых соединений высокотоксично в отношении линий клеток рака простаты PC3M и рака мочевого пузыря BXF с IC_{50} 0,72 и 1,43 мкМ, соответственно [81].

Шесть новых цитохалазинов с незамкнутой цепью и один известный [12]-цитохалазин были получены при ферментации морского гриба *Spicaria elegans*. Это первое сообщение о цитохалазинах, содержащих незамкнутую цепь. Вещества цитотоксичны [82].

Выделенный из Южно-Китайского моря гриб *Neosartorya pseudofischeri* синтезирует пять новых метаболитов и одиннадцать описанных ранее, в том числе пироны, нафталины, пиразины, пиразолы. Большая часть соединений проявляет цитотоксическую активность [83].

Два штамма морских грибов, отнесённых к сем. *Lindgomycetaceae*, были выделены: один из губки, обитающей в Балтийском море, другой — в Антарктике. Несмотря на различие регионов выделения грибов, в культурах обоих штаммов обнаружены одинаковые поликетидные метаболиты — новое соединение линдгомицин и близкий ему по структуре ранее описанный аскосетин. Новое вещество состоит из двух отдельных доменов, соединённых карбонилем, бициклического углеводорода и тетрамовой кислоты. Оба метаболита обладают антибиотической активностью в отношении клинически значимых грамположительных микроорганизмов, в том числе метициллиноустойчивых стафилококков (IC_{50} 5,1 и 3,2 мкМ), а также активны против некоторых грибов — патогенов сельскохозяйственных растений [84]).

Заключение

Морские грибы — неисчерпаемый источник биологически активных вторичных метаболитов. Выделению обитающих в морях продуцентов этих соединений, изучению химической структуры и биологической активности метаболитов посвящено большое количество исследований, число публикаций на эти темы постоянно возрастает. Настоящая статья представляет собой третью часть обзора публикаций последних лет, посвящённых биологически активным веществам, синтезируемым морскими микроорганизмами — актиномицетами и грибами.

Вторичные метаболиты, образуемые морскими грибами, чрезвычайно разнообразны по структуре и механизму их действия. Обнаружено значительное число новых, ранее не описанных соединений, некоторые — с уникальной структурой. Многие метаболиты обладают цитотоксической активностью и ингибируют различные линии опухолевых клеток. Выделен ряд метаболитов, обнаруживающих антибиотическую активность, в том числе против метициллиноустойчивых и об-

ладающих множественной устойчивостью стафилококков. Большой интерес представляют метаболиты, действующие на липидный обмен, на

ЛИТЕРАТУРА

- Nicoletti R., Trincon A. Bioactive compounds by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Mar Drugs* 2016; 14: 2: 37.
- Imhoff J.F. Natural products from marine fungi — still an underrepresented resource. *Mar Drugs* 2016; 14: 1: 19.
- Wang X., Mao Z-G, Song B-B. et al. Advances in the study of the structures and bioactivities of metabolites isolated from mangrove-derived fungi in the South China Sea. *Mar Drugs* 2013; 11: 10: 3601–3616.
- Wang M-H., Li X-M., Li C-S. et al. Secondary metabolites from *Penicillium pinophilum* SD-272, a marine sediment-derived fungus. *Mar Drugs* 2013; 11: 6: 2230–2238.
- Capon R.J., Stewart M., Ratnayake R. et al. Citromycetins and bilains A-C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. *J Nat Prod* 2007; 70: 11: 1746–1752.
- Sun Y., Takada K., Takemoto Y. et al. Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities. *J Nat Prod* 2012; 75: 1: 111–114.
- Peng J., Zhang X., Du L. et al. Sorbicatichols A and B, antiviral sorbicillinoids from the marine-derived fungus *Penicillium chrysogenum* PJX-17. *J Nat Prod* 2014; 77: 2: 424–428.
- Guo W., Peng J., Zhu T. et al. Sorbicillamines A-E, nitrogen-containing sorbicillinoids from the deep-sea-derived fungus *Penicillium* sp.F23-2. *J Nat Prod* 2013; 76: 11: 2106–2112.
- Guo W., Zhang Z., Zhu T. et al. Penicyclones A-E, antibacterial polyketides from the deep-sea-derived fungus *Penicillium* sp.F23-2. *J Nat Prod* 2015; 78: 11: 2699–2703.
- Kawahara T., Takagi M., Shin-ya K. JBIR-124: novel antioxidative agent from a marine sponge-derived fungus *Penicillium citrinum* Sp1080624G1f01 *J Antibiot* 2012; 65: 1: 45–47.
- Юрченко А.Н., Сметанина О.Ф., Калиновский А.И. и др. Биологически активные метаболиты из факультативного морского гриба *Penicillium citrinum*. Химия прир. соед. 2012; 6: 883–885. / Jurchenko A.N., Smetanina O.F., Kalinovskiy A.I. i dr. Biologicheski aktivnye metabolity iz fakul'tativnogo morskogo griba *Penicillium citrinum*. Himiya prirodoobraznykh soedineniy 2012; 6: 883–885. [in Russian]
- Chen L., Gong M-M., Peng Z-F. et al. The marine fungal metabolite, dicitrinon B, induces A375 cell apoptosis through the ROS-related caspase pathway. *Mar Drugs* 2014; 12: 4: 1939–1958.
- Li Y., Ye D., Shao Z. et al. A sterol and spiroditerpenoids from a *Penicillium* sp. isolated from a deep sea sediment sample. *Mar Drugs* 2012; 10: 2: 497–508.
- Smetanina O.F., Kalinovskiy A.I., Khudyakova Y.V. et al. Indole alkaloids produced by marine fungus isolate *Penicillium janthinellum* Biorge. *J Nat Prod* 2007; 70: 6: 906–909.
- Lin X., Zhou X., Wang F. et al. A new cytotoxic sesquiterpene quinone produced by *Penicillium* sp. F00120 isolated from a deep sea sediment sample. *Mar Drugs* 2012; 10: 1: 106–115.
- Liao L., Lee J-H., You M. et al. Penicillipyrones A and B, meroterpenoids from a marine-derived *Penicillium* sp. fungus. *J Nat Prod* 2014; 77: 2: 406–410.
- Ding Z., Zhang L., Fu J. et al. Phenylpyropenes E and F: new meroterpenes from the marine-derived fungus *Penicillium concentricum* ZLQ-69. *J Antibiot* 2015; 68: 12: 748–751.
- Zhuravleva O.I., Sobolevskaya M.P., Afiyatulloev S.S. et al. Sargassopenillines A-G, 6,6-spiroketal from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* and *Penicillium lividum*. *Mar Drugs* 2014; 12: 12: 5930–5943.
- Zhuravleva O.I., Sobolevskaya M.P., Leshchenko E.V. et al. Meroterpenoids from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* Maire and *Penicillium lividum* Westling. *J Nat Prod* 2014; 77: 6: 390–395.
- Sobolevskaya M.P., Zhuravleva O.I., Leshchenko E.V. et al. New metabolites from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* Maire and *Penicillium lividum* Westling. *Phytochemistry Letts* 2016; 15: 7–12.
- Li C-H., An C-Y, Li X-M. et al. Triazole and dihydroimidazole alkaloids from marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. *J Nat Prod* 2011; 74: 5: 1331–1334.
- Li C-H., Li X-M., Gao S-S. et al. Cytotoxic anthranilic acid derivatives from deep sea sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. *Mar Drugs* 2013; 11: 8: 3068–3076.
- de Silva E.D., Geiermann A.S., Mitova M.I. et al. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species. *J Nat Prod* 2009; 72: 3: 477–479.
- Gao S-S., Li X-M., Zhang Y. et al. Comazaphilones A-F, azaphilone derivatives from the marine sediment-derived fungus *Penicillium commune* QSD-17. *J Nat Prod* 2011; 74: 2: 256–261.
- Bu Y.Y., Yamazaki H., Ukai K., Namikoshi M. Penicillimide, an open-chain hemisuccinimide from Okinawan marine-derived *Penicillium copiticola*. *J Antibiot* 2015; 68: 8: 537–539.
- Fan Y-Q., Li P-H., Chao Y-X. et al. Alkaloids with cardiovascular effects from the marine-derived fungus *Penicillium expansum* Y32. *Mar Drugs* 2015; 13: 10: 6489–6504.
- Shin H.J., Pil G.B., Heo S-J. et al. Anti-inflammatory activity of tanzawaic acid derivatives from a marine-derived fungus *Penicillium steckii* 108YD142. *Mar Drugs* 2016; 14: 1: 14.
- You M., Liao L., Hong S.H. et al. Lumazine peptides from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Mar Drugs* 2015; 13: 3: 1290–1303.
- Peng J., Gao H., Zhang X. et al. Psychrophilins E-N and versicotide C, cyclic peptides from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60. *J Nat Prod* 2014; 77: 10: 2218–2223.
- Fremlin L.J., Piggott A.M., Lacey E., Capon R.J. Cottoquanzoline A and cottesiosins A and B, metabolites from an Australian strain *Aspergillus versicolor*. *J Nat Prod* 2009; 72: 4: 667–670.
- Takagi M., Motohashi K., Shin-ya K. Isolation of 2 new metabolites, JBIR-74 and JBIR-75, from the sponge-derived *Aspergillus* sp. fS14. *J Antibiot* 2010; 63: 7: 393–395.
- Izumikawa M., Hashimoto J., Takagi M., Shin-ya K. Isolation of two new terpeptin analogs - JBIR-81 and JBIR-82 - from a seaweed-derived fungus, *Aspergillus* sp. SpD081030G1f1. *J Antibiot* 2010; 63: 7: 389–391.
- Prompanya C., Fernandes C., Cravo S. et al. A new cyclic hexapeptide and a new isocoumarin derivative from the marine sponge-associated fungus *Aspergillus similanensis* KUFA 0013. *Mar Drugs* 2015; 13: 3: 1432–1450.
- Zhang M., Wang W-L., Fang Y-C. et al. Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowii*. *J Nat Prod* 2008; 71: 6: 985–989.
- Kim D.C., Quang T.H., Ngan N.T. et al. Dihydroisocoumarin derivatives from marine-derived fungal isolates and their anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced DV2 microglia. *J Nat Prod* 2015; 78: 12: 2948–2955.
- Miao F.P., Liang X.R., Liu X.H., Ji N.Y. Aspewentins A-C, norditerpenes from a cryptic pathway in an algicolous strain of *Aspergillus wentii*. *J Nat Prod* 2014; 77: 2: 429–432.
- Sun H-F., Li X-M., Meng L. et al. Asperolides A-C, tetranorlabdane diterpenoids from the marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus wentii* EN-48. *J Nat Prod* 2012; 75: 2: 148–152.
- Xu J., Nakazawa T., Ukai K. et al. Tetrahydrobostrycin and 1-deoxytetrahydrobostrycin, two new hexahydroanthrone derivatives, from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. *J Antibiot* 2008; 61: 7: 416–419.
- Cui C.M., Li X.M., Meng L. et al. 7-nor-ergosterolide, a pentalactone-containing norsteroid and related steroids from the marine-derived endophytic *Aspergillus ochraceus* EN-31. *J Nat Prod* 2010; 73: 11: 1780–1784.
- Lu Z., Wang Y., Miao C. et al. Sesquiterpenoids and benzofuranoids from the marine-derived fungus *Aspergillus ustus* 094102. *J Nat Prod* 2009; 72: 10: 1761–1767.
- Liu H., Edrada-Ebel R., Ebel R. et al. Drimane sesquiterpenoids from the fungus *Aspergillus ustus* isolated from the marine sponge *Suberites domuncula*. *J Nat Prod* 2009; 72: 9: 1585–1588.
- Lopez-Gresa M.P., Cabedo N., Gonzalez-Mas M.C. et al. Terretonins E and F, inhibitors of the mitochondrial respiratory chain from the marine-derived fungus *Aspergillus insuetus*. *J Nat Prod* 2009; 72: 7: 1348–1351.
- Wei H., Inada H., Hayashi A. Prenylterphenyllin and its dehydroxyl analogs, new cytotoxic substances from a marine-derived fungus *Aspergillus candidus* IF10. *J Antibiot* 2007; 60: 9: 586–590.
- Gao H., Zhou L., Cai S. et al. Diorcinols B-E, new prenylated diphenyl ethers from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60. *J Antibiot* 2013; 66: 9: 539–542.
- Li D., Xu Y., Shao C.L. et al. Antibacterial bisabolane-type sesquiterpenoids from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. *Mar Drugs* 2012; 10: 1: 234–241.
- Wu Q., Yu Q., Kurtan T. et al. Versixanthones A-F, cytotoxic xanthone-chromanone dimers from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* HDN 1009. *J Nat Prod* 2015; 78: 11: 2691–2698.
- Zhang Y., Li X.M., Wang B.G. et al. Nigerasperones A-C, new monomeric and dimeric naphtho- α -pyrones from the marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *J Antibiot* 2007; 60: 3: 204–210.

48. Zhang Y., Zhu T., Fang Y. et al. Carbonarones A and B, new bioactive γ -pyrone and α -pyridone derivatives from the marine-derived fungus *Aspergillus carbonarius*. J Antibiot 2007; 60: 2: 153–157.
49. Liu Y., Zhao S., Ding W. et al. Methylthio-aspochalasins from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. Mar Drugs 2014; 12: 10: 5124–5131.
50. Huang H., Wang F., Luo M. et al. Halogenated anthraquinones from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO F063. J Nat Prod 2012; 75: 7: 1346–1352.
51. Du C., Zhu T., Liu H. et al. Cytotoxic polyketides from a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus*. J Nat Prod 2008; 71: 11: 1837–1842.
52. Nguen H.P., Zhang D., Lee U. et al. Dehydroxychlorofusarielin B, an antibacterial polyoxygenated decalin derivative from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. J Nat Prod 2007; 70: 7: 1188–1190.
53. Ingavat N., Dobreiner J., Wiyakrutta S. et al. Aspergillusol A, an α -glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. J Nat Prod 2009; 72: 11: 2049–2052.
54. Fukuda T., Shinkai M., Sasaki E. et al. Graphiumins, new thiodiketopiperazines from the marine-derived fungus *Graphium* sp. OPMF00224. J Antibiot 2015; 68: 10: 620–627.
55. Kanoh K., Adachi K., Matsuda S. et al. New S-ulfalkylresorcinol from marine-derived fungus *Zygosporium* sp. KNC52. J Antibiot 2008; 61: 3: 192–194.
56. Almeida C., Equereva E., Kehraus S. et al. Hydroxylated sclerosporin derivatives from the marine-derived fungus *Cadophora malorum*. J Nat Prod 2010; 73: 3: 476–478.
57. Wu Z., Liu D., Proksch P. et al. Punctaporonins H-M: caryophyllene-type sesquiterpenoids from the sponge-associated fungus *Hansfordia sinuosae*. Mar Drugs 2014; 12: 7: 3904–3916.
58. Dias A.C., Ruiz N., Couzinet-Mossion A. et al. The marine-derived fungus *Clonostachys rosea*, source of a rare conjugated 4-Me-6E,8E-hexadecadienoic acid reducing viability of MCF-7 breast cancer cells and gene expression of lipogenic enzymes. Mar Drugs 2015; 13: 8: 4934–4948.
59. Zhao D.L., Shao C.L., Gan L.S. et al. Chromone derivatives from a sponge-derived strain of the fungus *Corynespora cassiicola*. J Nat Prod 2015; 78: 2: 286–293.
60. Yao Q., Wang J., Zhang X. et al. Cytotoxic polyketides from the deep-sea-derived fungus *Engyodontium album* DFFSCS021. Mar Drugs 2014; 12: 12: 5902–5915.
61. Xia M.W., Cui C.B., Li C.W. et al. Rare chromones from a fungal mutant of the marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. Mar Drugs 2015; 13: 8: 5219–5236.
62. Pontius A., Krick A., Mesry R. et al. monodictyochromes A and B, dimeric xanthone derivatives from the marine algalic fungus *Monodictya putredinis*. J Nat Prod 2008; 71: 11: 1793–1799.
63. Ding B., Yuan J., Huang X. et al. New dimeric members of the phomoxanthone family: phomolactonexanthones A, B and deacetylphomoxanthone C isolated from the fungus *Phomopsis* sp. Mar Drugs 2013; 11: 12: 4961–4972.
64. Pontius A., Krick A., Kehraus S. et al. Antiprotozoal activities of heterocyclic-substituted xanthones from the marine-derived fungus *Chaetomium* sp. J Nat Prod 2008; 71: 9: 1579–1584.
65. Kim M.Y., Sohn J.H., Ahn J.S., Oh H. Alternaramide, a cyclic depsipeptide from the marine-derived fungus *Alternaria* sp. J Nat Prod 2009; 72: 11: 2065–2068.
66. Yu Z., Lang J., Kajahn I. et al. Scopularides A and B, cyclodepsipeptides from a marine sponge-derived fungus, *Scopularopsis brevicaulis*. J Nat Prod 2008; 71: 6: 1052–1054.
67. Hayakawa Y., Hattori Y., Kawasaki T. et al. Efrapeptin J, a new down-regulator of the molecular chaperone GRP78 from a marine *Tolypocladium* sp. J Antibiot 2008; 61: 6: 365–371.
68. Zhang D., Yang X., Kang J.S. et al. Chlorohydroaspyrones A and B, antibacterial aspyrone derivatives from the marine-derived fungus *Exophiala* sp. J Nat Prod 2008; 71: 8: 1458–1460.
69. Zhang D., Yang X., Kang J.S. et al. Circumdatin I, a new ultraviolet-A protecting benzodiazepine alkaloid from a marine isolate of the fungus *Exophiala*. J Antibiot 2008; 61: 1: 40–42.
70. Jansen N., Ohlendorf B., Erhard A. et al. Helicusin E, isochromophilone X and isochromophilone XI: new chloroazaphilones produced by the fungus *Bartalinia robillardoides* strain LF550. Mar Drugs 2013; 11: 3: 800–816.
71. Ding L.J., Gu B.B., Jiao W.H. et al. New furan and cyclopentenone from the sponge-associated fungus *Hypocrea Koningii* PF04. Mar Drugs 2015; 13: 9: 5579–5592.
72. Harms H., Rempel V., Kehraus S. et al. Indoloditerpenes from a marine-derived fungal strain of *Dichotomomyces cejpui* with antagonistic activity at GPR18 and cannabinoid receptors. J Nat Prod 2014; 77: 3: 673–677.
73. Harms H., Orlikova B., Seungwon J. et al. Epipolythiodiketopiperazines from the marine derived fungus *Dichotomomyces cejpui* with NF-kB inhibitory potential. Mar Drugs 2015; 13: 8: 4949–4966.
74. Elsebaï M.F., Natesan L., Kehraus S. et al. HLE-ingibitory alkaloids with a polyketide skeleton from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. J Nat Prod 2011; 74: 10: 2282–2285.
75. Hu Z.X., Xue Y.B., Bi X.B. et al. Five new secondary metabolites produced by a marine-associated fungus, *Daldinia eschscholzii*. Mar Drugs 2014; 12: 11: 5563–5575.
76. Wang J., Wei X., Qin X. et al. Arthpyrones A–C, pyridine alkaloids from a sponge-derived fungus *Arthrinium arundinis* ZSDS1–F3. Org Lett 2015; 17: 3: 656–659.
77. Trisuvan K., Rukachaisirkul V., Sukpondma Y. et al. Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. J Nat Prod 2008; 71: 8: 1323–1326.
78. Lan W.J., Liu W., Liang W.L. et al. Pseudaboydins A and B: novel isobenzofuranone derivatives from marine fungus *Pseudallescheria boydii* associated with starfish *Acanthaster planci*. Mar Drugs 2014; 12: 7: 4188–4199.
79. Wijesekera I., Zhang C., Van Ta Q. et al. Physcion from marine-derived fungus *Microsporum* sp. Induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. Microbiol Res 2014; 169: 4: 255–261.
80. Li D., Wang F., Cai S. et al. Two new bisorbicillinoids isolated from a deep-sea fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. J Antibiot 2007; 60: 5: 317–320.
81. Mohamed I.E., Kehraus S., Krick A. et al. Mode of action of epoxyphormalins A and B and characterization of related metabolites from the marine-derived fungus *Paraconiothyrium* sp. J Nat Prod 2010; 73: 12: 2053–2058.
82. Liu R., Lin Z., Fang Y. et al. Novel open-chain cytochalasins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans*. J Nat Prod 2008; 71: 7: 1127–1132.
83. Lan W.J., Fu S.J., Xu M.Y. et al. Five new cytotoxic metabolites from the marine fungus *Neosartorya pseudofischeri*. Mar Drugs 2016; 14: 1: 18.
84. Wu B., Wiese J., Labes A. et al. Lindgomycin, an unusual antibiotic polyketide from a marine fungus of the *Lindgomycetaceae*. Mar Drugs 2015; 13: 8: 4617–4632.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Орлова Тамара Ивановна — д. м. н., старший научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Булгакова Вера Георгиевна — к. б. н., ст. научный сотрудник; ст. научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

Полин Анатолий Николаевич — д. б. н., профессор, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

**СУЩЕСТВУЕТ ЛИ СВЯЗЬ ВО ВРЕМЕНИ МЕЖДУ
БЕТА-ЛАКТАМАЗАМИ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА,
КАРБАПЕНЕМАЗАМИ И ГЕНОМ *MCR-1*?**

**EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASES,
CARBAPENEMASES AND THE *MCR-1* GENE:
IS THERE A HISTORICAL LINK?/M. RHOUMA*,
A. LETELLIER// INTERNATIONAL JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL AGENTS (IJAA), 2017;
49: 3: 269—271.**

Плазмида, содержащая ген *mcr-1*, кодирующий устойчивость энтеробактерий к колистину, в настоящее время идентифицирована на 5 континентах. В статье прослеживается в историческом аспекте обнаружение гена *mcr-1* совместно с генами бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз, поскольку в ряде сообщений отмечено присутствие гена *mcr-1* в штаммах *Escherichia coli*, продуцирующих БЛРС и карбапенемазу. Ретроспективное исследование показало, что идентификация гена *mcr-1* в штаммах *E. coli*, выделенных в 1980 гг., совпадает с первыми сообщениями о БЛРС. Первое выявление нью-делийской металло-бета-лактамазы (NDM-1) в 2009 г. ассоциируется со значительным ростом распространённости гена *mcr-1* среди штаммов *E. coli*, выделенных из продуктов животноводства. Авторы отмечают существование исторической связи между генами *mcr-1*, БЛРС и карбапенемаз с 1980 гг. и выражают уверенность, что для переоценки использования колистина в животноводстве необходим новый подход, включающий снижение использования не только колистина, но и всех антибиотиков.

* Chaire de recherche industrielle du CRSNG en salubrité des viandes (CRSV), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

**ЦИКЛИЧЕСКИЕ БОРОНАТЫ ПОДАВЛЯЮТ
БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ ВСЕХ КЛАССОВ.**

**CYCLIC BORONATES INHIBIT ALL CLASSES
OF β -LACTAMASES /S. T. CAHILL, R. CAIN, D. Y. WANG,
C. T. LOHANS, D. W. WAREHAM, H. P. OSWIN,
J. MOHAMMED, J. SPENCER, C. W. G. FISHWICK,
M. A. MCDONOUGH, C. J. SCHOFIELD*, J. BREM//
ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER. APRIL 2017;
61: 4: E02260—16.**

Антибиотикоустойчивость, опосредованная бета-лактамазами, представляет нарастающую угрозу использованию беталактамных антибиотиков. Применение ингибиторов сериновых бета-лактамаз (СБЛ): клавулановой кислоты, сулбактама, та-

зобактама, имеющих беталактамную структуру, а также ингибитора небеталактамной природы авибактама расширяет возможности использования бета-лактамных антибиотиков при бактериальных инфекциях, вызванных устойчивыми возбудителями, синтезирующими данные ферменты. Но эти ингибиторы неэффективны в отношении металло-бета-лактамаз (МБЛ), также катализирующих гидролиз этих соединений. К настоящему времени нет клинически приемлемых ингибиторов МБЛ. Главной клинической проблемой являются инфекции, сопровождающиеся одновременной продукцией СБЛ и МБЛ. Разработка ингибиторов «двойного действия», подавляющих СБЛ и МБЛ, представляет интерес, но сопряжена с трудностями из-за структурных и механистических различий ферментов двух классов. Как было установлено, циклические соединения борониевой кислоты подавляют как СБЛ, так и МБЛ. Они способны ингибировать все 4 класса бета-лактамаз, включая бета-лактамазу СТХ-М-15 расширенного спектра класса А, AmpC класса С из *Pseudomonas aeruginosa*, ферменты OXA класса D, способные гидролизовать карбапенемы. Было показано повышение эффективности применения беталактамных антибиотиков в отношении клинических штаммов грамотрицательных бактерий, продуцирующих различные бета-лактамазы. Сравнение кристаллической структуры комплекса СТХ-М-15 — циклический боронат и структур комплексов циклического бороната с другими бета-лактамазами выявило постоянный характер низкомолекулярных связей, что поддерживает предположение о том, что подобные молекулы «работают» подобно обычным тетраэдрическим анионным промежуточным продуктам катализа СБЛ и МБЛ.

* Chemistry Research Laboratory, University of Oxford, Oxford, United Kingdom.

**ФАРМАКОДИНАМИКА АВИБАКТАМА
В КОМБИНАЦИИ С ЦЕФТАРОЛИНОМ
ИЛИ ЦЕФТАЗИДИМОМ В ОТНОШЕНИИ
ПРОДУЦИРУЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗУ
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ИССЛЕДОВАННАЯ
НА *IN VITRO* МОДЕЛИ ИНФЕКЦИИ.**

**THE PHARMACODYNAMICS OF AVIBACTAM
IN COMBINATION WITH CEFTAROLINE
OR CEFTAZIDIME AGAINST β -LACTAMASE-
PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE STUDIED
IN AN *IN VITRO* MODEL OF INFECTION /
A. MACGOWAN*, S. TOMASELLI, A. NOEL, K. BOWKER //
J ANTIMICROB CHEMOTHER 2017; 72 (3): 762—769.**

Исследование фармакодинамики ингибиторов бета-лактамаз, как и новых комбинаций бета-лактама+ингибитор бета-лактамаз, относится к

области повышенного интереса на уровне разработки и клинической практики. Впервые выполнено прямое сравнение комбинаций нового ингибитора бета-лактамаз авибактама небеталактаманной природы с цефтаролином и цефтазидимом. На *in vitro* фармакокинетической модели была симитирована динамика «концентрация лекарства — время» клинических курсов цефтаролина (600 мг каждые 8 ч) и цефтазидима (2000 мг каждые 8 ч) при постоянной инфузии авибактама в пределах концентраций до 10 мг/л, и на протяжении свыше 72 ч было оценено антибактериальное действие на продуцирующую CTX-M *Escherichia coli*, гиперпродуцента AmpC *Enterobacter cloacae* и продуцента KPC *Klebsiella pneumoniae*. Максимальный бактериальный клиренс под действием авибактама в комбинации с цефтаролином и цефтазидимом в отношении штаммов *E. coli* и *E. cloacae* наблюдали на 72 ч при концентрации авибактама 1–2 мг/л. Для максимального снижения нагрузки *K. pneumoniae*, продуцирующего KPC, требовалась концентрация авибактама 4 мг/л. Была выполнена серия экспериментов по фракционированию доз авибактама в отношении указанных 3 штаммов, а также отношения AUC, C_{max} и времени (Т) превышения концентрации авибактама (1, 2 и 4 мг/л) к антибактериальному эффекту, выраженному изменением количества бактериальных клеток на 24 ч. Наилучшим образом с антибактериальным эффектом авибактама на 24 ч соотносились показатели AUC и C_{max} без преимущества одного показателя над другим. Поскольку AUC является более лёгким в выполнении и надёжным фармакокинетическим показателем, чем C_{max} , он может быть полезным для исследования того, как показатели на основе AUC в экспозициях с авибактамом могут использоваться для переложения результатов настоящего исследования в терапию конкретного больного.

* E-mail: alasdar.macgowan@nlt.nhs.uk

МОГУТ ЛИ ЦЕФТАЗИДИМ-АВИБАКТАМ И АЗТРЕОНАМ ПРЕОДОЛЕВАТЬ УСТОЙЧИВОСТЬ К БЕТА-ЛАКТАМАМ, ОБУСЛОВЛЕННУЮ МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗАМИ ENTEROBACTERIACEAE?

CAN CEFTAZIDIME-AVIBACTAM AND AZTREONAM OVERCOME β -LACTAM RESISTANCE CONFERRED BY METALLO- β -LACTAMASES IN ENTEROBACTERIACEAE? / S. MARSHALL, A. M. HUJER, L. J. ROJAS, K. M. PAPP-WALLACE, R. M. HUMPHRIES, B. SPELLBERG, K. M. HUJER, E. K. MARSHALL, S. D. RUDIN, F. PEREZ, B. M. WILSON, R. B. WASSERMAN, L. CHIKOWSKI, D. L. PATERSON, A. J. VILA, D. VAN DUIN, B. N. KREISWIRTH,

H. F. CHAMBERS, V. G. FOWLER JR., M. R. JACOBS, M. E. PULSE, W. J. WEISS, R. A. BONOMO*//
ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER APRIL 2017; 61: 4: 2243–2216.

На основании знаний гидролитического профиля основных бета-лактамаз грамотрицательных бактерий была испытана эффективность комбинации цефтазидим — авибактам (CAZ-AVI) с азтреонамом (АТМ) в отношении устойчивых к карбапенему энтеробактерий, образующих металло-бета-лактамазы (МБЛ). Первоначально выполненное тестирование чувствительности диско-диффузионным методом (ДДМ) на агаре было использовано для определения *in vitro* эффективности уникальной комбинации CAZ-AVI+АТМ в отношении 21 репрезентативного штамма Enterobacteriaceae, содержащего *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AmpC} и их комбинации. Были проведены определения гибели клеток во времени (time-kill assays) и оценена *in vivo* эффективность комбинации на модельной инфекции бедра у нейтропенических мышей. Согласно ДДМ все (21) штаммы были устойчивы к CAZ-AVI, а 19 из 21 — устойчивы к АТМ. Активность *in vitro* CAZ-AVI +АТМ в отношении энтеробактерий, продуцирующих разнообразные МБЛ, была установлена в отношении 17/21 штаммов с зоной подавления ≥ 21 мм. Все штаммы при добавлении АТМ продемонстрировали снижение значений МПК CAZ-AVI, определённые методом разведений в агаре. По данным определений «time-kill» на 2 ч снижение нагрузки в группах, обработанных CAZ-AVI+АТМ (8 мкг/мл), было $\geq 4\text{-log}_{10}$ -КОЕ по сравнению с обработанными только CAZ-AVI. У мышей с модельной инфекцией бедра на 24 ч снижение бактериальной нагрузки в режиме CAZ-AVI (32 мг/кг каждые 8 ч + АТМ (32 мг/кг каждые 8 ч) было почти на 4-log_{10} -КОЕ больше по сравнению с группой, получавшей только CAZ-AVI (32 мг/кг каждые 8 ч). Представленные данные требуют тщательного изучения новой комбинации для терапии инфекций, вызванных продуцирующими МБЛ штаммами Enterobacteriaceae.

* Department of Medicine, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, USA.

АВИБАКТАМ УСИЛИВАЕТ АКТИВНОСТЬ ЦЕФТАЗИДИМА *IN VITRO* В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВОЙ К БЕТА-ЛАКТАМАМ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА МОДЕЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ.

POTENTIATION OF CEFTAZIDIME BY AVIBACTAM AGAINST β -LACTAM-RESISTANT *PSEUDOMONAS*

AERUGINOSA IN AN IN VITRO INFECTION MODEL /
S. K. B. SY, L. ZHUANG, M.-E. BEAUDOIN, P. KIRCHER,
C. GRUNWITZ, S. PIEPER, V. J. SCHUCK, W. W.
NICHOLS, H. DERENDORF* // J ANTIMICROB
CHEMOTHER 2017; 72 (4): 1109—1117.

Методом «time-kill» количественно оценивали *in vitro* фармакодинамику комбинаций цефтазидима и ингибитора бета-лактамаз небеталактамной природы авибактама в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивых к цефтазидиму, пиперациллин-тазобактаму и меропенему. Для 8 штаммов *P. aeruginosa* были определены значения МПК цефтазидима при добавлении 0—16 мг/л авибактама, а также на одночастной модели исследовали кинетику гибели бактериальных клеток 3 штаммов в течение 24 ч при концентрации авибактама 0—16 мг/л в комбинации с 0,25—4×МПК цефтазидима. В ходе «time-kill» кинетических исследований снижения концентраций цефтазидима и авибактама оценивали степень их деградации, измеренную методом LC-MS/MS. Авибактам не обладал антимикробной активностью, но значения МПК цефтазидима снижались в 8—16 раз в присутствии 4 мг/л авибактама. Изменения показателей $\log_{10}$ КОЕ/мл на 10 и 24 ч (по сравнению с исходным (0 ч) свидетельствовали о бактерицидном действии при значении $\geq$ МПК. Для получения такого же уровня бактерицидности требовались значительно более высокие концентрации одного цефтазидима по сравнению с его концентрациями в комбинации с авибактамом. В отсутствии авибактама происходило значительное разрушение (деградация) цефтазидима (определённая как $t_{1/2} < 24$ ч), достигая на 8 ч $19 \pm 18\%$ исходной концентрации при использовании самого устойчивого штамма. При комбинации с авибактамом деградация ≥ 1 МПК цефтазидима была незначительной. Итак, добавление авибактама дозо-зависимо защищало цефтазидим и восстанавливало бактерицидную и бактериостатическую активность комбинаций при концентрациях ниже МПК отдельно взятого цефтазидима.

* Department of Pharmaceuticals, College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ ЛЁГОЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ УСТОЙЧИВОЙ К КАРБАПЕНЕМАМ KLEBSIELLA PNEUMONIAE, РАЗВИВАЕТСЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ЦЕФТАЗИДИМ-АВИБАКТАМУ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ МУТАЦИЯМИ В ПЛАЗМИДНОМ ГЕНЕ *bla*_{KPC-3}.

EMERGENCE OF CEFTAZIDIME-AVIBACTAM RESISTANCE DUE TO PLASMID-BORNE *bla*_{KPC-3}

MUTATIONS DURING TREATMENT OF CARBAPENEM-RESISTANT KLEBSIELLA PNEUMONIAE INFECTIONS / R. K. SHIELDS, L. CHEN, S. CHENG, K. D. CHAVDA, E. G. PRESS, A. SNYDER, R. PANDEY, Y. DOI, B. N. KREISWIRTH, M. H. NGUYEN*, C. J. CLANCY // ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER MARCH 2017; 61: 3: E02097—16.

Цефтазидим-авибактам (ЦЕФ-АВБ) — новая комбинация бета-лактама и ингибитора бета-лактамаз, активная в отношении устойчивых к карбапенемам Enterobacteriaceae (CRE), образующих *Klebsiella pneumoniae* карбапенемазу (КРС). Настоящее сообщение впервые описывает развитие устойчивости к ЦЕФ-АВБ в процессе лечения CRE инфекций, а также механизмы устойчивости. Устойчивая к ЦЕФ-АВБ *Klebsiella pneumoniae* была выявлена у трёх больных после 10—19 дневного лечения ЦЕФ-АВБ. Для идентификации возможных механизмов устойчивости было выполнено секвенирование целого генома (WGS), чувствительного и устойчивого к ЦЕФ-АВБ штаммов *Klebsiella pneumoniae*, в результате чего были определены мутации в плазмидном гене *bla*_{KPC-3}, отсутствующие в исходных штаммах. Мутации *bla*_{KPC-3} произошли в штаммах независимо друг от друга, результатом чего стало образование нового подтипа сиквенс-типа 258 и КРС-3 вариантов. Статус детерминант устойчивости мутаций был подтверждён определением значений МПК ЦЕФ-АВБ и других антибиотиков после разрушения указанного гена, плазмидного переноса и клонирования *bla*_{KPC} в компетентный штамм *Escherichia coli*. Степень влияния вариантов КРС-3 на значение МПК ЦЕФ-АВБ выражалась в порядке увеличения: D179Y/T243M двойное замещение >D179Y>V240G. Интересно, что мутации снижали МПК меропенема в ≥ 4 раза от исходного значения, сохраняя у двух больных чувствительность *K. pneumoniae* к меропенему. Значения МПК цефепима и цефтриаксона также были снижены в ≥ 4 раза у D179Y/T243M и D179Y вариантов штаммов, но чувствительность при этом не восстанавливалась. Обратной транскрипционной ПЦР было установлено, что экспрессия *bla*_{KPC-3} у D179Y/T243M и D179Y вариантов снижена по сравнению с экспрессией *bla*_{KPC-3} у исходных штаммов. Развитие устойчивости, опосредованной *bla*_{KPC-3} мутациями у *K. pneumoniae* после 10—19 дней экспозиции с ЦЕФ-АВБ, представляется угрожающей, но клиническое значение этого может быть оптимистичнее, если у некоторых штаммов сохраняется чувствительность к карбапенемам.

* Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

**НИЗКАЯ ЧАСТОТА УСТОЙЧИВОСТИ
К ЦЕФТАЗИДИМ-АВИБАКТАМУ СРЕДИ
СОДЕРЖАЩИХ *bla*_{KPC} ШТАММОВ
ENTEROBACTERIACEAE, ВЫДЕЛЕННЫХ В БОЛЬНИЦАХ
США В 2012—2015 ГГ.**

**LOW FREQUENCY OF CEFTAZIDIME-AVIBACTAM
RESISTANCE AMONG ENTEROBACTERIACEAE ISOLATES
CARRYING *bla*_{KPC} COLLECTED IN U.S. HOSPITALS
FROM 2012 TO 2015 /M. CASTANHEIRA*, R. E. MENDES,
H. S. SADER//ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHER
MARCH 2017; 61: 3: E02369—2316.**

С увеличением числа публикаций о штаммах Enterobacteriaceae, образующих карбапенемазу *Klebsiella pneumoniae* (KPC), выбор средств лечения инфекций, вызванных такими микроорганизмами, становится более ограниченным. Оценивали активность цефтазидим—авибактама (ЦЕФ-АВБ) и антибиотиков сравнения в отношении 456 штаммов Enterobacteriaceae, продуцентов *bla*_{KPC}, выделенных в 79 больницах США в 2012—2015 гг. В целом, самыми активными были ЦЕФ-АВБ (МПК_{50/90}, 0,5/2 мкг/мл; 99,3% чувствительность) и тигециклин (МПК_{50/90}, 0,5/1 мкг/мл; 98,9% чувствительность при ≤2 мкг/мл). К колистину и амикацину чувствительными были, соответственно, 80,5 и 59,0% штаммов. Три штамма (0,7%), устойчивые к ЦЕФ-АВБ (*K.pneumoniae*; МПК≥16 мкг/мл) были исследованы методами секвенирования целого генома и определения относительной величины уровня экспрессии поринов и помпового выброса. У двух штаммов наряду с другими механизмами устойчивости к беталактамам были обнаружены гены металло-бета-лактамаз, *bla*_{NDM-1} or *bla*_{VIM-4}, у третьего штамма — преждевременно терминирующий кодон (стоп-кодон) в *ompK35* и сниженная экспрессия *ompK36*. ЦЕФ-АВБ был активен в отношении 100,0 и 99,3%, соответственно, продуцентов *bla*_{KPC-3} (n=221) и *bla*_{KPC-2} (n=145). Содержащие *bla*_{KPC} штаммы обычно выявляли в случае пневмонии (n=155), инфекций мочевого тракта (n=93), кожи и мягких тканей (n=74). ЦЕФ-АВБ был активен в отношении возбудителей инфекций различной локализации. Показатели чувствительности штаммов *K.pneumoniae* (83,3% коллекции) составили 99,2% к ЦЕФ-АВБ, 98,9% к тигециклину, 80,1% к колистину. Чувствительность к ЦЕФ-АВБ штаммов, выделенных от больных ОИТ и других отделений клиники, варьировала незначительно. Итак, ЦЕФ-АВБ был активен в отношении большинства продуцирующих *bla*_{KPC} штаммов коллекции и представляет ценное дополнение к арсеналу средств лечения инфекций, вызванных KPC-продуцирующими энтеробактериями.

* JMI Laboratories, North Liberty, Iowa, USA.

**ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В КЛЕТОЧНОЙ
ОБОЛОЧКЕ *ESCHERICHIA COLI* НА *IN VITRO*
АНТИБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
КОМБИНАЦИЙ АВИБАКТАМ—БЕТА-ЛАКТАМЫ.**

**IMPACT OF DEFINED CELL ENVELOPE MUTATIONS
IN *ESCHERICHIA COLI* ON THE *IN VITRO*
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AVIBACTAM/β-LACTAM
COMBINATIONS /S. M. MCLEOD, S. A. PATEY,
M. D. HUBAND, W. W. NICHOLS* // INTERNATIONAL
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2017;
49: 4: 437–442.**

Разработаны комбинации нового ингибитора бета-лактамаз небеталактамной структуры авибактама с цефтазидимом, цефтаролином и азтреонамом для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Авибактам защищает антибактериальную активность указанных антибиотиков, подавляя действие бета-лактамаз Ambler классов A, C и некоторых — класса D. Клеточная оболочка грамотрицательных бактерий представляет сложный барьер для водорастворимых соединений и содержит множественные молекулярные детерминанты чувствительности и устойчивости к антибиотикам. Для определения роли отдельных детерминант в проявлении активности авибактама и комбинаций антибиотиков с ним на основе штамма *E.coli* W3110 был сконструирован ряд изогенных штаммов с делециями специфических компонентов клеточной оболочки, а также мутант, экспрессирующий бета-лактамазу CTX-M-15, служащий индикатором, оценивающим активность авибактама. В случае мутаций, приводящих к урезанию липополисахарида (ЛПС), в результате чего снижается исходный уровень выброса или нарушается состав порина наружной мембраны, заметного влияния на *in vitro* активность отдельно взятых цефтазидима, цефтаролина или азтреонама и их комбинаций с авибактамом не наблюдалось. На основании оценки МПК исходного чувствительного штамма ни беталактамы, ни авибактам не являлись субъектом выброса. Ни одиночные, ни двойные мутации в области порина не снижали чувствительности к испытуемым антибиотикам, что даёт основание предположить, что для проникновения через наружную мембрану указанные соединения используют другие пути, не отдавая предпочтения порину.

* Entasis Therapeutics, Waltham, Massachusetts, USA.

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКИ НМВ-1, НОВОЙ
МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ ПОДКЛАССА B1,
ОБНАРУЖЕННОЙ В КЛИНИЧЕСКОМ ШТАММЕ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA.**

GENETIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF HMB-1, A NOVEL SUBCLASS B1 METALLO- β -LACTAMASE FOUND IN A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL ISOLATE / N. PFENNIGWERTH*, F. LANGE, C. B. CAMPOS, M. HENTSCHE, S. G. GATERMANN, M. KAASE // J ANTIMICROB CHEMOTHER 2017; 72 (4): 1068—1073.

Исследовали новую металло-бета-лактамазу (МБЛ) подкласса B1, обнаруженную в клиническом штамме *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью. Штамм *P.aeruginosa* NRZ-03096 был выделен в 2012 г. из анального мазка больного, госпитализированного в северной Германии, и характеризовался высокими значениями МПК карбапенемов. Генетическая характеристика нового *bla* гена и MLST были выполнены секвенированием целого генома (WGS). Для биохимической характеристики и определения кинетических параметров K_m и k_{cat} фермента новый *bla* ген был экспрессирован в *Escherichia coli* TOP10. Штамм *P.aeruginosa* NRZ-03096 был устойчив ко всем испытанным бета-лактамам и относился в МБЛ фенотипу. В опытах по клонированию фрагментов дробления генома был получен клон, образующий новый фермент подкласса B1 с 74,3% идентичностью с ближайшим «родственником» — КНМ-1. Новая МБЛ была названа НМБ-1 (гамбургская МБЛ). Анализ данных WGS выявил локализацию гена *bla*_{НМБ-1} в хромосоме как часть транспозона семейства Tn3, и был назван Tn6345. Экспрессия *bla*_{НМБ-1} в *E.coli* TOP10 приводила к повышенной устойчивости к бета-лактамам. Определение K_m и k_{cat} показало, что НМБ-1 имеет гидролитические характеристики, отличающиеся от таковых КНМ-1, а именно более низкую скорость гидролиза цефалоспоринов и более высокую — имипенема. Идентификация НМБ-1, кроме того, проясняет характер распространения и диверсификации карбапенемаз грамотрицательных патогенов человека, особенно *P.aeruginosa*.

* German National Reference Laboratory for Multi-drug Resistant Gram-negative Bacteria, Department of Medical Microbiology, Ruhr University Bochum, Universitätsstrasse 159, Bochum 44801, Germany.

ДЕЙСТВИЕ КОЛИСТИНА НА МАТРИЦУ БИОПЛЁНКИ *ESCHERICHIA COLI* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

EFFECTS OF COLISTIN ON BIOFILM MATRICES OF *ESCHERICHIA COLI* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / M. KLINGER-STROBEL*, C. STEIN, C. FORSTNER, O. MAKAREWICZ, M.W. PLETZ // INTERN J ANTIMICROB AGENTS (IJAA) 2017; 49: 4: 472—479.

Биоплёнки являются формой существования микроорганизмов на различных поверхностях, как-то катетерах, сердечных клапанах. Они ассоциируются с различными трудно поддающимися лечению рецидивирующими инфекциями и обеспечивают экстремально высокий рост толерантности к большинству антибиотиков. Задачей исследования было оценить действие колистина на внеклеточную матрицу биоплёнки и включённые в неё клетки метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA), вида с присущей ему устойчивостью к колистину, и клетки чувствительной к колистину *Escherichia coli*. Биоплёнки MRSA и *E.coli* обрабатывали различными концентрациями колистина. Минимальную эрадицирующую биоплёнки концентрацию (MBEC) и эффективность колистина при редукции планктонной фракции определяли по количеству оставшихся жизнеспособных клеток (КОЕ/мл). Включённые в биоплёнку клетки окрашивали по принципу «живые/мёртвые» и анализировали конфокальным лазерным сканирующим микроскопированием (CLSM). Количественную оценку результатов микроскопирования выполняли с помощью алгоритма qBA. В отличие от MRSA степень редукции биоплёнки и планктонных клеток *E.coli* существенно зависела от концентрации колистина. Вместе с тем, было показано, что обработка колистином оказывала редуцирующее действие на матрицу биоплёнки как лабораторных, так и клинических штаммов MRSA и *E.coli*. Поскольку экспозиция с колистином провоцировала быстрое появление высокоустойчивых клонов монотерапию колистином следует выполнять с большой осторожностью. Согласно полученным результатам, можно полагать, что колистин дестабилизирует матричную структуру биоплёнки у таких видов с природной устойчивостью к колистину, как *S.aureus*, высвобождая при этом планктонные клетки, более чувствительные к антибиотикам.

* Center for Infectious Diseases and Infection Control, Jena University Hospital, Erlanger Allee 101, 07747 Jena, Germany.

РУКОВОДСТВО ПО ДОЗИРОВАНИЮ В/В КОЛИСТИНА У ТЯЖЁЛЫХ БОЛЬНЫХ.

DOSING GUIDANCE FOR INTRAVENOUS COLISTIN IN CRITICALLY ILL PATIENTS / R. L. NATION, S. M. GARONZIK, V. THAMLIKITKUL, E. J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, A. FORREST, D. L. PATERSON, J. LI FERNANDA P. SILVEIRA* // CLIN INFECT DIS 2017; 64 (5): 565—571.

Трудность применения колистина состоит в том, что концентрации в плазме, обеспечивающие ан-

тибактериальный эффект, частично совпадают с концентрациями, вызывающими нефротоксичность, а также из-за большой вариабельности фармакокинетики у больных. Целью исследования была разработка алгоритма, позволяющего достичь желаемого стационарного уровня концентрации колистина в плазме ($C_{ss,avg}$), равного 2 мг/л. Данные «концентрация в плазме—время» у 214 взрослых тяжёлых больных (клиренс креатинина 0—236 мл/мин, 29 больных получали заместительную почечную терапию (RRT), были предметом популяционного фармакокинетического анализа. Разработка алгоритма для больных, не получавших RRT, основывалась на отношении между дозой колестиметата, необходимого для достижения желаемого значения $C_{ss,avg}$ и клиренсом креатинина. Увеличение клиренса креатинина в случае получения больными RRT определяли популяционным анализом и корректировали дополнительным дозированием. Для баланса между антибактериальным эффектом и риском нефротоксичности алгоритм строился таким образом, чтобы при $C_{ss,avg} \geq 2$ целевой уровень был достигнут у >80%; у <30% при $C_{ss,avg} \geq 4$ мг/л. Когда алгоритм дозирования применяли у больных, не получавших RRT (включая прерывистый диализ в недиализные дни), у >80% больных с клиренсом креатинина <80 мл/мин наблюдали достижение $C_{ss,avg} \geq 2$ мг/л, но у больных с клиренсом креатинина ≥ 80 мл/мин, цели достигали только у <40%, даже при максимально разрешённой суточной дозе 360 мг (в расчёте на основе). У больных, получавших RRT, желаемая цель у >80% больных была достигнута при дополнительном дозировании. Во всех категориях больных <30% достигали цели при $C_{ss,avg} \geq 4$ мг/л. В настоящем проекте был разработан клинически приемлемый алгоритм дозирования и обозначены обстоятельства, при которых в/в монотерапия может быть неадекватной.

* Division of Infectious Diseases, University of Pittsburgh Medical Center, Pennsylvania, USA.

НЕФРОТОКСИЧНОСТЬ ПОЛИМИКСИНОВ: СУЩЕСТВУЮТ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ КОЛИСТИМЕТАТОМ И ПОЛИМИКСИНОМ В?

NEPHROTOXICITY OF POLYMYXINS: IS THERE
ANY DIFFERENCE BETWEEN COLISTIMETHATE AND
POLYMYXIN B? / A. P. ZAVASCKI, R. L. NATION* //
ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER MARCH 2017;
61: 3: E02316—E02319.

Нефротоксичность — наиболее обычное побочное явление при клиническом применении полимиксинов, колистина и полимиксина В, которое огра-

ничивает дозу обоих полимиксинов, т. к. концентрации полимиксинов в плазме, вызывающие нарушения функции почек, частично совпадают с концентрациями, необходимыми для проявления антибактериального эффекта. Поскольку развитие острой почечной недостаточности (ОПН) в процессе терапии крайне нежелательно, очень важно знать существует ли разница токсического потенциала колистина, вводимого в форме неактивного пролекарства колестиметата, и полимиксина В, вводимого в активной форме. Оба полимиксина цитотоксичны в отношении почечных тубулярных клеток и склонны вызывать нефротоксичность *in vivo*, поэтому предметами обзора являются регулирующие механизмы почек, облегчающие аккумуляцию (способствующие аккумуляции) этих соединений в тубулярных клетках, а также данные о более высокой степени ОПН у больных, леченных колестиметатом по сравнению с лечеными полимиксином В. Это может быть обусловлено различиями фармакокинетики и механизмов, почечной регуляции колестиметата и образующегося колистина в сравнении с полимиксином В и, следовательно, относительных количеств полимиксиновых соединений, доставляемых в тубулярные клетки. Более низкий риск развития ОПН с полимиксином В является одним из его возможных преимуществ перед колестиметатом. Сравнительная безопасность и эффективность двух соединений нуждается в более детальной проверке в условиях правильно спланированных клинических исследований.

* Drug Delivery, Disposition and Dynamics, Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Monash University, Melbourne, Australia.

АКТИВНОСТЬ ПРОЛОНИРОВАННОГО ЭХИНОКАДИНА (CD101) И СЕМИ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ, ИСПЫТАННАЯ НА КОЛЛЕКЦИИ СОВРЕМЕННЫХ ИНВАЗИВНЫХ ШТАММОВ ГРИБОВ ПО ПРОГРАММЕ SENTRY 2014 ANTIFUNGAL SURVEILLANCE PROGRAM.

ACTIVITY OF A LONG-ACTING ECHINOCANDIN (CD101)
AND SEVEN COMPARATOR ANTIFUNGAL AGENTS
TESTED AGAINST A GLOBAL COLLECTION OF
CONTEMPORARY INVASIVE FUNGAL ISOLATES IN THE
SENTRY 2014 ANTIFUNGAL SURVEILLANCE PROGRAM
/ M. A. PFALLER, S. A. MESSER, P. R. RHOMBERG,
M. CASTANHEIRA* // ANTIMICROB AGENTS
CHEMOTHER MARCH 2017; 61: 3: E02045—16.

По методикам Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), оценивали активность CD101 и противогрибковых препаратов сравнения в отношении 606 инвазивных грибковых штаммов из

всемирной коллекции, собранной в 2014 г. Все штаммы *Candida albicans* ($n=251$), *Candida tropicalis* ($n=51$), *Candida krusei* ($n=16$) и *Candida dubliniensis* ($n=11$) подавлялись $\leq 0,12$ мкг/мл CD101 и были чувствительными или относились к дикому типу чувствительности по отношению к другим испытанным эхинокандинам. Пять штаммов *C. glabrata* ($n=100$) имели значения МПК CD101 от 1 до 4 мкг/мл, повышенные значения МПК каспофунгина ($2- >8$ мкг/мл), анидулафунгина ($2-4$ мкг/мл) и микафунгина ($2-4$ мкг/мл), а также содержали мутации в *fks1* и *fks2*. *Candida parapsilosis* ($n=92$) и *Candida orthopsilosis* ($n=10$) показали более высокие значения МПК CD101 (в пределах 0,5—4 мкг/мл и 0,12—2 мкг/мл, соответственно), подобные результаты были получены с другими испытанными эхинокандинами. Устойчивость к флуконазолу была отмечена у 11,0% штаммов *Candida glabrata*, 4,3% *C. parapsilosis*, и по 2,0% *C. albicans* и *C. tropicalis*. Активность CD101 в отношении *Aspergillus fumigatus* ($n=56$) была сходной с активностью микафунгина, в 2 раза выше активности каспофунгина, но ниже активности анидулафунгина. Эти штаммы имели дикий тип чувствительности к итраконазолу, вориконазолу и посаконазолу. Эхинокандины имели сходную активность в отношении *Cryptococcus neoformans* ($n=19$). В отношении штаммов наиболее часто выделяемых от больных с инвазивными грибковыми инфекциями, CD101 был так же активен, как другие эхинокандины. Пролонгированный характер действия очень желателен для профилактики и лечения тяжёлых грибковых инфекций, особенно у больных, которые могут быть выписаны из больницы для завершения противогрибковой терапии на амбулаторной основе.

* JMI Laboratories, North Liberty, Iowa, USA.

МИКАФУНГИН ИЗМЕНЯЕТ МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ, НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ОСНОВНЫХ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ СУБИНГИБИТОРНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ.

MICAFUNGIN ALTERS THE AMINO ACID, NUCLEIC ACID AND CENTRAL CARBON METABOLISM OF CANDIDA

ALBICANS AT SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS: NOVEL INSIGHTS INTO MECHANISMS OF ACTION / A. KATRAGKOU, M. WILLIAMS, S. STERNBERG, D. PANTAZATOS, E. ROILIDES, T. J. WALSH* // J ANTIMICROB CHEMOTHER 2017; 72 (3): 712—716.

Эхинокандины представляют важный класс антигрибковых соединений, используемых при инвазивном кандидозе, но о влиянии эхинокандинов на метаболизм *Candida* известно немного. Для определения метаболического отклика *Candida* на действие возрастающих концентраций микафунгина было выполнено профилирование метаболитов на основе высокоразрешающего метода LC-HRMS. Штаммы *C. albicans* культивировали на нитроцеллюлозных фильтрах до середины логарифмической фазы роста при добавлении микафунгина (0—0,25 мг/л). На стадии середины логарифмической фазы метаболизм репликантов был подавлен. Анализ внутриклеточных метаболитов был выполнен с помощью метода LC-HRMS. Изменения размера пула отдельных метаболитов были определены по методу Стьюдента, адаптированного для множественного тестирования с применением коррекции по Бенжамину-Хохбергу (Benjamini-Hochberg). Описание метаболитов было выполнено по базе данных метаболических путей Киотской Энциклопедии генов и геномов (KEGG). Из 3446 выявленных метаболитов 204 были идентифицированы в результате сравнения с чистыми стандартами или использованием базы данных по времени удерживания массы. Снижение количества пятидесяти метаболитов коррелировало с увеличением концентрации микафунгина. Пул метаболитов аминокислот, нуклеиновых кислот и полиамина при субингибиторных концентрациях увеличивался, а при экспозиции с ингибиторными концентрациями резко снижался. Итак, микафунгин индуцирует нарушение вторичного метаболизма, подавляя синтез белка и деление клеток, что проливает свет на новые механизмы действия эхинокандинов.

* Departments of Pediatrics, Microbiology and Immunology, Weil Cornell Medicine, Cornell University, New York, NY, USA.

Подготовлено Н. С. Бондаревой (Москва)

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

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

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

**УДОБНО
ДЛЯ ВРАЧЕЙ!**



Универсальный противовирусный препарат

- широкий спектр действия
- высокий профиль безопасности
- прямое противовирусное действие
- индукция эндогенного интерферона
- большой опыт применения



Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой 150 мг, N 10, 20, 50.
Р N001049/02 от 12.12.2007 раствор для в/в и в/м введения 125 мг/мл, 5 ампул по 2 мл.
Р N001049/03 от 28.08.2007 линимент 5%, 5 мл, 30 мл Р N001049/01 от 05.03.2010.

ООО «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФИРМА «ПОЛИСАН»
INFO@POLYSAN.RU WWW.POLYSAN.RU

РОССИЯ, 192102, Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ,
УЛ. САЛОВА, Д. 72, КОР. 2, ЛИТ. А,
ТЕЛ./ФАКС: +7 (812) 710-82-25

