

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 58



7-8'2013

Научно-практический журнал

ЦИКЛОФЕРОН®



- Первый российский низкомолекулярный индуктор интерферона
- Безопасность, надежность и доказанная эффективность
- Производится в соответствии с международным стандартом качества GMP

Самый быстрый индуктор интерферона

Корректор естественного иммунитета
Широкий спектр противовирусного действия

Форма выпуска:

раствор для инъекций
125 мг/мл в ампулах по 2 мл №5;
таблетки по 150 мг, покрытые
кишечнорастворимой оболочкой, № 10 (50)
линимент 5% тубы по 5 мл и 30 мл

Показания к применению:

Таблетки

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

Инъекции

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

Линимент

(Рег№ 001049/01):
вагиниты, парадонтиты,
герпетическая инфекция
кожи и слизистых оболочек

Противопоказания:

беременность, период лактации,
повышенная чувствительность к
компонентам препарата,
детский возраст до 4-х лет,
декомпенсированный цирроз печени

мы создаем
УНИКАЛЬНОЕ

 ПОЛИСАН

191119, Россия, Санкт-Петербург,
Лиговский пр. д. 112.
Тел: + 7 (812) 710-82-25
E-mail: marketing@polyan.ru

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»
Published 12 times a year
Founded in 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.
ГНЦА
Тел.: 8-499-611-20-77
Факс: 8-499-611-42-38
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Зав. редакцией Л. Б. Смирнова
Корректор: А. Н. Лобусева

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

Подписка по каталогу Роспечать:

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

*Подписка через 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 2013

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 58

7—8'2013

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.
Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Член-корр РАМН, проф., д. м. н. Белоусов Ю. Б.
Проф., д. м. н. Белобородов В. А.
Проф. Говорун В. М.
Проф. Гомберг М. А.
Д. б. н. Даниленко В. Н.
Проф. 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.	Клясова Г. А.
Бибикова М. В.	Ленёва И. А.
Васильев А. Н.	Митрохин С. Д.
Волжанин В. М.	Романцов М. Г.
Дмитриева Н. В.	Сычев Д. А.
Долгова Г. В.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Цыбанев А. А.
Зуева Л. П.	Ших Е. В.
Ильина Е. Н.	

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

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

Оригинальные статьи

Тренин А. С.
Микробные модели для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов

В помощь практикующему врачу

Серебрякова Е. Н., Волосников Д. К., Глазырина Г. А.
Особенности антибактериальной терапии новорождённых с полиорганной недостаточностью
Василенко И. П., Романцов М. Г., Крюков А. И., Григорян С. С., Коваленко А. Л.
Циклоферон как средство противорецидивной терапии больных хроническим гиперпластическим синуситом
Хостелиди С. Н., Волкова А. Г., Попова М. О., Богомолова Т. С., Колбин А. С., Бойченко Э. Г., Подольцева Э. И., Климович А. В., Белогурова М. Б., Медведева Н. В., Зюзгин И. С., Зубаровская Л. С., Васильева Н. В., Клишко Н. Н.
Мукормикоз у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге
Иванов В. М., Иванова О. В., Шейкин М. В.
Роль внутрикостного введения антибиотиков при лечении местнораспространенного рака слизистой оболочки полости рта

Безопасность ЛС

Фомин Е. В., Байчоров И. Х., Ших Е. В., Сизова Ж. М.
Доклиническое изучение влияния лекарственных средств на активность цитохрома P450 и прогнозирование субстратной принадлежности как способ прогнозирования безопасности применения комбинированной терапии

Обзоры

Богущ Т. А., Попова А. С., Дудко Е. А., Игнатова Е. О., Полоцкий Б. Е., Тюляндин С. А., Давыдов М. И.
Дискордантность статуса эстрогеновых рецепторов между первичным и метастатическим раком молочной железы — возможные причины и прогностическая значимость
Белобородова Н. В., Осипов А. А., Бедова А. Ю.
Биологические свойства некоторых низкомолекулярных ароматических микробных метаболитов, ассоциированных с сепсисом

По страницам журналов

Original Papers

3 Trenin A. S.
Microbial Models in Screening of Inhibitors of Sterol Biosynthesis

Guidelines for Practitioners

12 Serebryakova E. N., Volosnikov D. K., Glazyrina G. A.
Characteristics of Antibiotic Therapy in Neonates with Polyorgan Insufficiency
17 Vasilenko I. P., Romantsov M. G., Krukov A. I., Grigoryan S. S., Kovalenko A. L.
Cycloferon as an Agents of Antirelpsing Therapy in Patients with Chronic Hyperplastic Sinusitis
23 Khostelidi S. N., Volkova A. G., Popova M. O., Bogomolova T. S., Kolbin A. S., Boychenko E. G., Medvedeva N. V., Podoltseva E. I., Klimovich A. V., Belogurova M. B., Zuzgin I. S., Zuborovskaya L. S., Vasilyeva N. V., Klimko N. N.
Invasive Mucormycosis in Patients with Hemoblastosis in St.-Petersburg
30 Ivanov V. M., Ivanova O. V., Sheikin M. V.
Role of Intraosteal Administration of Antibiotics in Treatment of Local Oral Mucinous Carcinoma

Drug Safety

34 Fomin E. V., Baychorov I. H., Shih E. V., Sizova Zh. M.
Preclinical Investigation of Pharmaceuticals Impact Against Cytochrome P450 Activity and Prognosis of Substrate Affinity as Means for Providing Substrate Therapy Safety

Reviews

40 Bogush T. A., Popova A. S., Dudko E. A., Polotsky B. E., Tjuljandin S. A., Davydov M. I.
Discordance of Estrogen Receptor Status Between Primary and Metastatic Breast Cancer: Possible Reasons and Prognostic Value
48 Beloborodova N. V., Osipov A. A., Bedova A. Yu.
Biological Properties of Some Sepsis-Associated Low Molecular Aromatic Microbial Metabolites

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.

Микробные модели для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов

А. С. ТРЕНИН

ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» РАМН, Москва

Microbial Models in Screening of Inhibitors of Sterol Biosynthesis

A. S. TRENIN

Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia (GINA RAMS)

На основе ранее разработанных микробных моделей предлагается высокоэффективная схема поиска ингибиторов биосинтеза стеролов (ИБС). Она основана на использовании галофильной бактериальной культуры *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *Halobacterium halobium*), обладающей мевалонатным путём биосинтеза стеролов, и модели грибной культуры *Acremonium fusidioides* (по прежней классификации *Fusidium coccineum*), образующей фузидиевую кислоту (фузидин) — антибиотик стероидной структуры, биосинтез которого в организме гриба-продуцента имеет значительное сходство с биосинтезом холестерина в организме человека. В модели *H. salinarum* ИБС выявляются как соединения, подавляющие рост тест-культуры, а в модели *A. fusidioides* — как соединения, резко снижающие продукцию фузидина при отсутствии заметного влияния на рост продуцента. Внесение мевалоновой кислоты — одного из ключевых интермедиатов биосинтеза стеролов, снимает ингибирующее действие многих микробных метаболитов и, таким образом, служит доказательством их влияния на ранние этапы биосинтеза стеролов, включая этап работы ГМГ-КоА редуктазы. Оба теста разработаны в виде микрометодов, легко поддаются механизации благодаря миниатюризации микробиологических процессов, выращиванию культур в стерильных 96-луночных планшетах и использованию автоматических микропипеток. Сравниваются результативность обоих тестов, их чувствительность, трудоёмкость, а также способность давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты в поиске ИБС. Предложенная схема поиска ИБС, включает в себя использование обеих микробных моделей на ранних этапах поисковых работ и культуры клеток Hep G2 на поздних этапах, а также обязательный отбор на начальном этапе микробных метаболитов, обладающих противогрибковой активностью. Рассматриваются вопросы миниатюризации и механизации микробиологических работ, а также способы очистки культуральной жидкости продуцентов путём микро- и ультрафильтрации.

Ключевые слова: ингибиторы биосинтеза стеролов, противогрибковые и противоопухолевые антибиотики, микробные модели поиска антибиотиков, фузидин, холестерин, мевалоновая кислота, ГМГ-КоА редуктаза, Hep G2, миниатюризация микробиологических процессов, микро- и ультрафильтрация.

On the base of previously developed microbial models high effective scheme for screening of inhibitors of sterol biosynthesis (ISB) is proposed. It is based on cultivation of halophilic bacteria *Halobacterium salinarum* (former *Halobacterium halobium*), possessing mevalonate pathway of sterol biosynthesis, and cultivation of fungus *Acremonium fusidioides* (former *Fusidium coccineum*), that is producer of steroid antibiotic fusidin (fusidic acid), which biosynthesis has great similarity (with coincidence of its initial steps till squalene formation) to cholesterol biosynthesis in human organism. In *H. salinarum* model ISB are revealed as compounds that inhibit test-culture growth, whereas in *A. fusidioides* test-system they are revealed as compounds that strongly reduce fusidin production without any visible influence on producer's growth. Mevalonate that is one of the crucial intermediates of sterol biosynthesis remove inhibition induced by many microbial metabolites that is the evidence of their action at early stages of sterol biosynthetic pathway, including HMG-CoA reductase step. Both test-systems are developed as micromethod and could be easily mechanized due to miniaturization of microbiological procedures, cultivation in sterile 96-well plates and usage of automatic micropipettes and dispensers. Effectiveness of both test-systems, as well as their sensitiveness, laboriousness and ability to give false-positive or false-negative results in ISB screening work is compared. The proposed scheme of screening of ISB includes microbial models at early steps of screening procedures and Hep G2 test-system at the late step. The preliminary screening of microbial metabolites possessing antifungal activity at initial step is compulsory. Miniaturization and mechanization of microbial processes and purification of producers' culture broth with micro- and ultrafiltration are under consideration as well.

Введение

Микробные вторичные метаболиты — ингибиторы биосинтеза стеролов (ИБС), в первую

очередь статины — ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы), хорошо зарекомендовали себя в лечении и профилактике атеросклероза, показали высокую эффективность в лечении ряда онкологических заболеваний [1—4]. Ингибиторы более поздних этапов биосинтеза стеролов, в частности, инги-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБУ НИИНА

биторы сквален-синтазы, сквален-эпоксидазы и сквален-монооксигеназы, также могут оказаться эффективными препаратами для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6], а ингибиторы Р-450 зависимой деметилазы ланостерола, являются, по-видимому, действенным средством лечения грибковых инфекций [7]. В настоящее время развернут широкий поиск ИБС среди продуктов жизнедеятельности различных микроорганизмов, как грибов, так и актиномицетов [8, 9].

Успех поисковых работ во многом зависит от эффективности применяемых тест-систем, в особенности на начальном этапе отбора. Поскольку требования, предъявляемые к тест-системам, весьма разнообразны, создание единой универсальной модели поиска метаболитов, обладающих специфической биологической активностью, отвечающей всем этим требованиям, становится, как правило, невозможным. Необходимо разработка не только специальных тестов, обладающих различной эффективностью на разных этапах поиска, но и соответствующей схемы поисковых работ.

Использование на начальных этапах поиска ферментных систем [10–12] не гарантирует того, что отобранные соединения, активно подавлявшие соответствующую реакцию *in vitro*, смогут достигать природную мишень и, соответственно, проявить свои потенциальные качества в реальных условиях [13, 14]. Кроме того, отбор, основанный на использовании биохимических реакций, как правило, требует анализа высокоочищенных соединений и плохо применим на ранних этапах поиска природных метаболитов, содержащих большое количество примесей [15, 16].

Более целесообразным является применение моделей, основанных на использовании целых клеток, включая как одноклеточные, так и многоклеточные организмы, в т. ч. фруктовую мушку *Drosophila melanogaster*, нематоды *Caenorhabditis elegans* и др. [14, 17], а также культуры клеток млекопитающих [12, 18, 19]. Особый интерес в качестве модельных тест-систем для поиска биологически активных микробных метаболитов, в т. ч. ИБС, представляют различные микробные культуры [12, 19, 20–23].

Предложенные нами методы поиска ИБС основаны на использовании культуры клеток млекопитающих — гепатобластомы G2 (Нер G2), а также микробных культур — грибной культуры *Acremonium fusidioides* и бактериальной культуры *Halobacterium salinarum* [24–26].

В основу метода отбора ИБС с помощью культуры клеток Нер G2 положена количественная оценка включения радиоизотопных предшественников в холестерин (ХС) и отдельные фракции липидов и выявление соединений, подавляющих это включение [24]. В тесте с культурой *A.fusid-*

oides ИБС выявляются как соединения, резко снижающие продукцию фузидина при отсутствии заметного влияния на рост продуцента [25]. В модели *H.salinarum* ИБС выявляются как соединения, подавляющие рост тест-культуры [26]. Тесты с *A.fusidioides* и *H.salinarum* разработаны в виде микрометодов. Серьезное внимание уделено также миниатюризации микробиологических методов работы с микробными продуцентами и использованию микро- и ультрафильтрации для очистки их культуральной жидкости.

Указанные модели показали свою высокую эффективность, поскольку в ходе развёрнутого в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе РАМН широкого поиска ИБС они позволили обнаружить ряд соединений, обладающих способностью к подавлению биосинтеза стеролов [27–30]. Выявление ИБС и образующих их микроорганизмов стало возможным благодаря применению специальной схемы поиска, разработанной на основе детального сравнения применяемых моделей, в т. ч. при сопоставлении их надёжности, чувствительности, трудоёмкости, а также способности давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

Материал и методы

Реактивы и материалы. В работе использовали препараты антибиотиков зарубежных и отечественных компаний, а также антибиотики, полученные в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, РАМН. Используемый в тест-системе препарат лактона D,L-мевалонной кислоты («Sigma», США) подвергали сапонификации — выдерживали в слабощелочной среде для получения кислотной формы: 1 М раствор лактона в 0,1 н NaOH инкубировали при 50°C в течение 2 ч, либо при 37°C в течение 4 ч.

Контрольным препаратом при выявлении ИБС служил ловастатин («MSD», США).

Для стерилизации проб культуральной жидкости применяли одноразовые стерильные фильтры Sterivex (диаметр пор 0,22 мкм) фирмы «Millipore», США. В целях концентрирования препаратов культуральной жидкости проводили их лиофилизацию на лиофилизационной установке SUE 300 Q («Heto», Швеция).

Условия культивирования, среды, определение биологической активности. Культуры актиномицетов и грибов выделяли из образцов почвы и выращивали при температуре 28°C на агаризованных средах: актиномицеты — на среде Гаузе 1 и Гаузе 2, грибы — на сусло-агаре и кислом агаре Чапека [24–26].

Выращивание культур в жидких питательных средах проводили на средах: Гаузе 2, 2663 (соево-глицериновой), 5339, Т, А4 (соево-глюкозной), 11654, АМ, соево-сахарозной и кукурузно-крахмальной в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл с наполнением 50–200 мл на качалках при 28°C в течение 3–11 суток, как описано ранее [25, 26], а также в стерильных плоскодонных 6- и 24-луночных пластиковых планшетах («Flow», Великобритания; «Costar», Франция; «Медполимер», С-Пб.) без встряхивания в термостате при 28°C в течение 3–9 суток. Для создания условий асептики при разливе микробиологических сред и пересеве микробных культур применяли микрофильтры. Объём проб составлял 0,5 мл при использовании 24-луночных планшетов и 1 мл при использовании 6-луночных планшетов. В качестве инокулята использовали выращенные на агаризованных средах 7–10-суточные культуры.

Рост культур в жидкой среде контролировали с помощью инвертированного микроскопа непосредственно в лунках планшета, фотометрическими методами по уровню поглощения света при 490 и 540 и 570 нм, а также по сухому весу мицелия.

Для фотометрического определения биомассы мицелиальных организмов проводили предварительную дезинтеграцию мицелия продуцентов ультразвуком с использованием генератора «Dawe Sonuprobe», Англия, непосредственно в ячейках 6-луночных планшетов. Фотометрическое определение роста проводили с помощью ручных и автоматизированных микроплет-спектрофотометров вертикального сканирования «Uniscan», «Multiscan» (Германия), «ИФКО-2» (Россия).

Для получения сухого мицелия накопившуюся в лунках планшетов биомассу помещали в полимерные центрифужные пробирки объёмом 1,5 см³ («Erpendorf», Германия; «Медполимер», С-Пб.), осаждали центрифугированием и высушивали при температуре 80°C в течение 2 ч, после чего взвешивали на аналитических весах.

Антибиотическую активность определяли методом штриха на агаровой среде при выращивании продуцентов на плотных питательных средах и методом диффузии в агаре при выращивании в жидких средах — в отношении различных бактериальных тест-микроорганизмов и грибов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus humicola* ATCC 9949, *Aspergillus niger* ATCC 16404 и *Fusarium oxysporum* VKM F-140 (= CMI, IMI 90473).

Выделение и очистка антибиотиков проведены, как описано ранее [24–26] Культуральную жидкость и мицелий продуцентов разделяли фильтрацией или центрифугированием. Выделение антибиотиков из фильтрата культуральной жидкости проводили сорбцией на смоле Амберлит XAD-2, или экстракцией этилацетатом при кислотном (4,0) и нейтральном значениях pH. Полученный после упаривания в вакууме осадок растворяли в небольшом объёме 60% EtOH. Экстракцию антибиотиков из мицелия проводили 80% EtOH.

Хроматографическую очистку и разделение компонентов перспективных препаратов проводили методом колоночной хроматографии. Определяли физико-химические характеристики полученных соединений. Для идентификации выделенных антибиотических веществ использовали компьютерную базу данных природных биологически активных веществ (BNPD), разработанную Я. Берди (Венгрия).

Микро- и ультрафильтрационная очистка культуральной жидкости продуцентов. Для очистки методом ультрафильтрации применяли предварительное дифференциальное центрифугирование культуральной жидкости с отсечением фрагментов, превышающих 1000 S (центрифуга «Beckman JB-21», Австрия, ротор JA-20, 18 тыс. об/мин, 60 мин) и 6 S (ультрацентрифуга «Beckman L 5-65», Австрия, ротор Ti 50.2, 40 тыс. об/мин, 19 ч, 10°C). При получении проб, объём которых не превышал 1 мл, использовали микроцентрифугу «ELMI MF-05», Латвия (10.000 об/мин, 2 раза по 25 мин).

Ультрафильтрацию под давлением проводили с использованием ультрафильтров с НПМВ, от 100 тыс. до 10 тыс. Д («Millipore», США; «Владипор», РФ). Ультрафильтрацию с применением центрифугирования проводили в центрифуге «Beckman JB-21», Австрия (ротор JA-20, 18 тыс. об/мин, 60 мин) в патронах UFC-2 и в микроцентрифуге «ELMI MF-05», Латвия (10.000 об/мин, 40 мин) в патронах UFC-3 ТТК 00 и UFC-3 TGC 00 с НПМВ 30.000 и 10.000 Д («Millipore», США).

Прошедшую ультрафильтрационную обработку к.ж. стерилизовали фильтрацией через фильтры Sterivex («Millipore», США) с диаметром пор 0,22 мкм и концентрировали лиофилизацией на установке SUE 300 Q («Нето», Швеция).

Тест-системы для выявления ИБС. Работу с культурой клеток гепатобластомы Нер G2, а также бактериальной культурой *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *Halobacterium halobium* ATCC 29341) и грибной культурой

Acremonium fusidioides (*Fusidium coccineum* Fuckel ATCC 14700) проводили, как описано ранее [24–26].

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 и обсуждение

Миниатюризация микробиологических исследований в работе с микробными продуцентами и микробными тест-культурами. Стремление к использованию микрометодов — заметная тенденция в современной микробиологии. В последнее время культивирование микробных штаммов в микропробах с объёмом питательной среды, не превышающим 750–1000 мкл, получает всё большее распространение в исследовании продуцентов антибиотиков [31, 32].

В наших исследованиях выращивание культур свежесделанных из почвы микробных продуцентов, а также микроорганизмов, используемых в качестве тест-культур, проводилось в стерильной пластиковой посуде импортного или отечественного производства, предназначенной для проведения иммунологических тестов или культивирования клеток млекопитающих. Объём проб в эксперименте составлял 1 мл и менее (вплоть до 50 мкл). Культивирование микроорганизмов в минимальных объёмах питательной среды позволило резко снизить расход питательных сред и отказаться от использования специальных аэрирующих приборов (качалки и пр.). Малый объём проб, их компактное расположение на планшете позволило использовать автоматические дозаторы, в т. ч. многоканальные, для разлива питательных сред, содержащих микробный инокулюм, и внесения испытуемых веществ, что способствовало значительному ускорению постановки экспериментов, а также увеличению числа повторов в опыте. Появилась возможность резкого увеличения числа тестируемых метаболитов. В целом, трудоёмкость процесса изучения штаммов-продуцентов значительно уменьшилась.

Количественная оценка роста таких продуцентов, как актиномицеты и плесневые грибы, представляет определённую сложность, в силу способности этих микроорганизмов к образованию нитевидного мицелия, затрудняющего фотометрическое определение роста культуры. В связи с этим наиболее часто используемым методом оценки роста мицелиальных культур традиционно является измерение сухой массы мицелия.

Результаты, представленные на рис. 1, демонстрируют возможность замены указанного метода на фотометрическое определение роста при условии предварительной обработки мицелия продуцента ультразвуком с помощью ультразву-

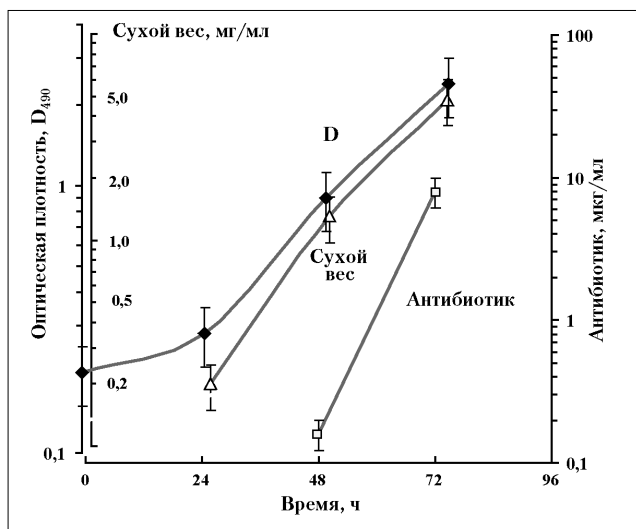


Рис. 1. Рост и продукция антибиотика культурой *Fusidium* sp.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат левая (1): оптическая плотность (D_{490}); по оси ординат левая (2): сухой вес, мг/мл; по оси ординат правая: антибиотик, мг/мл.

кового дезинтегратора непосредственно в ячейках 6-лучных планшетов. Результаты, полученные при использовании такого подхода, не уступают данным трудоёмкого метода определения биомассы по сухому весу мицелия. Указанное наблюдение практически значимо, особенно если учесть, что традиционные методы определения роста мицелиальных организмов с трудом поддаются автоматизации [33, 34].

Успешное выращивание микробных продуцентов в пластиковой посуде с использованием микрообъёмов питательной среды показывает целесообразность использования микрометодов в разработке новых микробных тест-систем. Новые микробные тест-системы, необходимые для поиска ИБС, разработаны нами в виде микрометодов [25, 26].

Использование микро- и ультрафильтрационной очистки микробных метаболитов. Очистку биологически активных соединений от высокомолекулярных примесей, препятствующих их определению в специальных тестах, проводили ультрафильтрацией в сочетании со скоростным центрифугированием. Предложены две основные схемы частичной очистки культуральной жидкости продуцентов без применения химических методов (рис. 2).

Первая схема включала в себя подготовительные процедуры в виде осаждения крупных механических примесей центрифугированием с отсечением частиц крупнее 1 тыс. S и последующую микрофильтрацию (0,17 мкм) в установке «Millipore» 1225 (США) с одновременной обработкой до 12 микро-проб культуральной жидкости различных продуцентов.

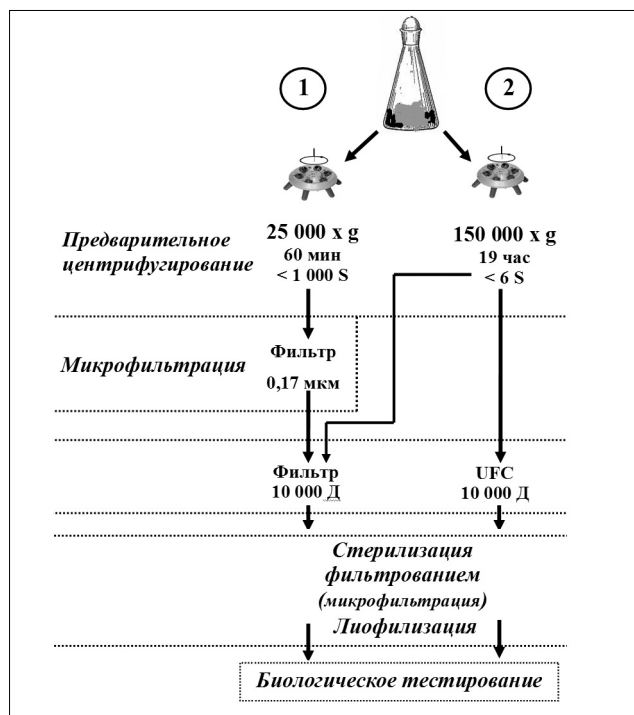


Рис. 2. Очистка культуральной жидкости микробных продуцентов.

В дальнейшей очистке была использована ультрафильтрация под давлением. В результате последовательного применения ультрафильтров с НПМВ от 100 тыс. до 10 тыс. Д проводили отсеечение всех высокомолекулярных соединений.

По второй схеме, благодаря отсечению фрагментов крупнее 6 S, появлялась возможность применения центрифужных фильтрующих патронов с НПМВ 30000 и 10000, позволяющая избежать работы под давлением и, таким образом, существенно ускоряющая процесс очистки.

При отсутствии необходимости получения препаратов в значительном объёме на начальном этапе очистки применяли лабораторную микроцентрифугу. Проведённое с её помощью предварительное центрифугирование позволяло избавиться от осадка и сразу перейти к ультрафильтрации с использованием миниатюрных ультрафильтрационных центрифужных патронов, обладающих, соответственно, НПМВ 30.000 и 10.000. Подобная обработка, применяемая с целью получения очищенных препаратов в количестве, не превышающем 0,5 мл, давала возможность проведения всей очистки, включая начальное скоростное центрифугирование и последующую ультрафильтрацию, с использованием одного прибора — микроцентрифуги. При этом обрабатывали пробы культуральной жидкости одновременно нескольких продуцентов.

Благодаря проведённой на конечном этапе очистки стерилизационной фильтрации и лиофилизации устранялась микробная контаминация, что поз-

Таблица 1. Распределение активных и неактивных штаммов в микробных тестах в сравнении с результатами их испытания в модели Нер G2

№ п/п	Модель поиска		Число штаммов-продуцентов				
	наименование модели	отбор ингибиторов биосинтеза	активные	неактивные	всего	% активных в тесте Нер G2 от числа активных в микробном тесте	% ложноположительных результатов
1	<i>A.fusidioides</i> Нер G2	стеролов холестерин	34 24 (34—10)	68 78 (68+10)	102	— 71	29 —
2	<i>H.salinarum</i> Нер G2	стеролов холестерин	65 25 (65—40)	45 85 (45+40)	110	— 38	62 —

воляло проводить анализ полученных проб методами, чувствительными к микробному заражению.

Лиофилизация помогает провести концентрирование биологически активных микробных метаболитов, способствуя, тем самым, их более уверенному выявлению в микробных и биохимических тестах *in vitro*, и увеличивает сроки хранения полученного материала.

С помощью описанных выше методов проведена очистка культуральной жидкости свыше 300 новых микробных продуцентов ИБС, в т. ч. штаммов 4281, F-13 и F-86, а также микробных метаболитов — потенциальных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ [35]. Концентраты, полученные из культуральной жидкости с помощью ультрафильтрационной обработки, обнаруживали высокую активность при испытании в культурах клеток и в биохимических тестах.

Таким образом, применение известных методов в новой схеме очистки биологически активных микробных метаболитов способствовало не только ускорению процесса очистки, но и увеличению эффективности дальнейшего тестирования препаратов. Предложенный подход может быть рекомендован в качестве эффективного дополнения к классическим методам химического выделения и очистки антибиотиков.

Оценка эффективности разработанных моделей, схема поиска ИБС. Специальные модели, необходимые для поиска биологически активных соединений, должны отвечать ряду требований, в частности:

- позволять делать корректные выводы о характере биологической активности тестируемых метаболитов;
- обладать достаточно высокой чувствительностью;
- не давать ложноотрицательных результатов¹;
- не давать большого числа ложноположительных результатов²;
- применяться на разных этапах скрининга, в т. ч. на начальных этапах работы с продуцентами (желательно на уровне тестирования культуральной жидкости и грубоочищенных препаратов);

- быть относительно недорогими и простыми в использовании;
- обладать высокой пропускной способностью;
- быть перспективными для дальнейшей механизации и автоматизации.

Очевидно, что при поиске метаболитов, обладающих специфической биологической активностью, практически невозможно создание универсальной модели, отвечающей всем перечисленным выше критериям в равной степени. Необходима разработка и использование комплекса тестов, обладающих различной эффективностью на разных этапах поисковой работы, т. е. необходима разработка не только специальных тестов, но и соответствующей схемы их применения.

В создании эффективной схемы поиска биологически активных соединений необходимо строго оценивать все позитивные и негативные качества разработанных моделей, в т.ч. уровень их надёжности, чувствительности, трудоёмкости, а также возможность использования на ранних этапах отбора.

Большинство предложенных нами моделей применимы для оценки грубоочищенных препаратов культуральной жидкости и мицелия продуцентов и, таким образом, могут использоваться на начальных этапах отбора. Вместе с тем предложенные модели обладают серьёзными отличиями.

Модель с применением клеток Нер G2 широко используется в мировой практике для оценки синтеза ХС, обладает высокой точностью благодаря количественному анализу биосинтеза липидов в клетке. Она демонстрирует высокую надёжность. С её помощью можно не только эффективно отбирать собственно ингибиторы биосинтеза ХС и ингибиторы АХАТ, но также проводить детальный анализ механизма действия таких метаболитов [24]. Вместе с тем указанная модель предъявляет повышенные требования к очистке тестируемых препаратов и, в силу достаточно высокой трудоёмкости, не позволяет проводить скрининг одновременно большого числа соединений.

Значительно удобнее для поиска ИБС, особенно на начальном этапе исследований, оказы-

¹ В противном случае при проведении отбора будут в большом количестве отсеиваться ценные метаболиты.

² В противном случае отбор теряет свою эффективность, поскольку осуществляется слишком малый отсев ненужных веществ.

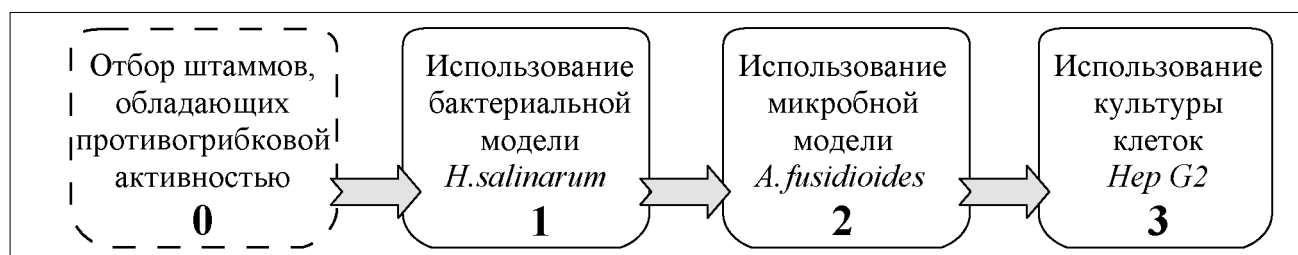


Рис. 3. Биологические модели в поиске ИБС.

ваются микробные модели, практически не дающие ложноотрицательных результатов, однако различающиеся по своей способности к отсеvu соединений, не имеющих гипополидемической активности.

Для выявления этих отличий было проведено сопоставление активности микробных метаболитов, проверенных одновременно в микробных моделях и в культуре Hep G2 (табл. 1).

Микробные модели проявили высокую надёжность: все метаболиты, активные в тесте Hep G2, оказались активными в микробных моделях, а среди метаболитов, неактивных в микробных моделях (68 — в модели *A. fusidioides* и 45 — в модели *H. salinarum*), не было ни одного, который бы проявил свою активность в тесте Hep G2. Следовательно, микробные модели *A. fusidioides* и *H. salinarum* не дают ложноотрицательных результатов, их применение практически не вызывает неправомерного отсева потенциально перспективных культур.

Из 34 штаммов, активных в микробной модели *A. fusidioides*, способностью к подавлению биосинтеза ХС в клетках Hep G2 обладали метаболиты 24 штаммов. Экстракты 10 штаммов, активных в микробном тесте, не подавляли включения ^{14}C -ацетата в ХС фракцию в клетках Hep G2. Таким образом, при оценке биосинтеза ХС число ложноположительных результатов теста *A. fusidioides* составило 29%.

Из 65 штаммов, активных в микробной модели *H. salinarum*, способностью к подавлению биосинтеза ХС в клетках Hep G2 обладали метаболиты 25 штаммов. Активность 40 штаммов в тесте Hep G2 не подтвердилась. Таким образом, у значительно более простой с точки зрения технического исполнения бактериальной модели *H. salinarum* процент ложноположительных результатов выше и составляет 62%. Следовательно, тест *H. salinarum* способствует отбору большого числа разнообразных соединений, не имеющих прямого отношения к ингибированию биосинтеза ХС.

В сравнении с тестом Hep G2 обе микробные модели позволяют отбирать не только ингибиторы биосинтеза ХС, но и ингибиторы биосинтеза других стеролов. Кроме того, модель *H. salinarum* позволяет проводить отбор противоопухолевых антибиотиков [26].

Таким образом, несмотря на то, что обе микробные модели могут быть использованы на начальных этапах отбора, их тщательное сопоставление позволяет вскрыть серьёзные различия между ними и прийти к выводу о целесообразности использования бактериальной модели *H. salinarum* на более ранних, по сравнению с *A. fusidioides*, этапах отбора (рис. 3). В таком случае достигается значительная экономия ресурсов, а главное — возникает возможность проведения одновременного отбора как ИБС, в том числе ингибиторов поздних этапов синтеза, среди которых могут быть потенциальные противогрибковые препараты, так и противоопухолевых антибиотиков.

При отборе ингибиторов ранних этапов биосинтеза ХС оба микробных теста обладают равной ценностью, поскольку в варианте использования мевалоновой кислоты позволяют дать быстрый и обоснованный ответ относительно способности испытуемых метаболитов подавлять ранние этапы биосинтеза стеролов (включая ГМГ-КоА редуктазу) без привлечения дополнительных дорогостоящих методов.

Проявление противогрибковой активности культур в отношении хотя бы одного из трёх грибных штаммов: *A. niger*, *F. oxysporum* или *C. albicans* позволяет повысить вероятность обнаружения ИБС до 28–42% (табл. 2). Без предварительного определения противогрибковой активности выделяемых штаммов, вероятность обнаружения среди них продуцентов ИБС не превышает 2–5%.

Приведённые факты свидетельствуют о целесообразности использования в первичном скрининге ИБС специального предварительного эта-

Таблица 2. Способность к подавлению биосинтеза стеролов у микробных штаммов, обладающих противогрибковой активностью

Микроорганизмы	Число штаммов с противогрибковой активностью	Из них продуцентов ИБС
Грибы	127	54 (42%)
Актиномицеты	110	31 (28%)

Примечание. Общее число протестированных штаммов грибов и актиномицетов 5000.

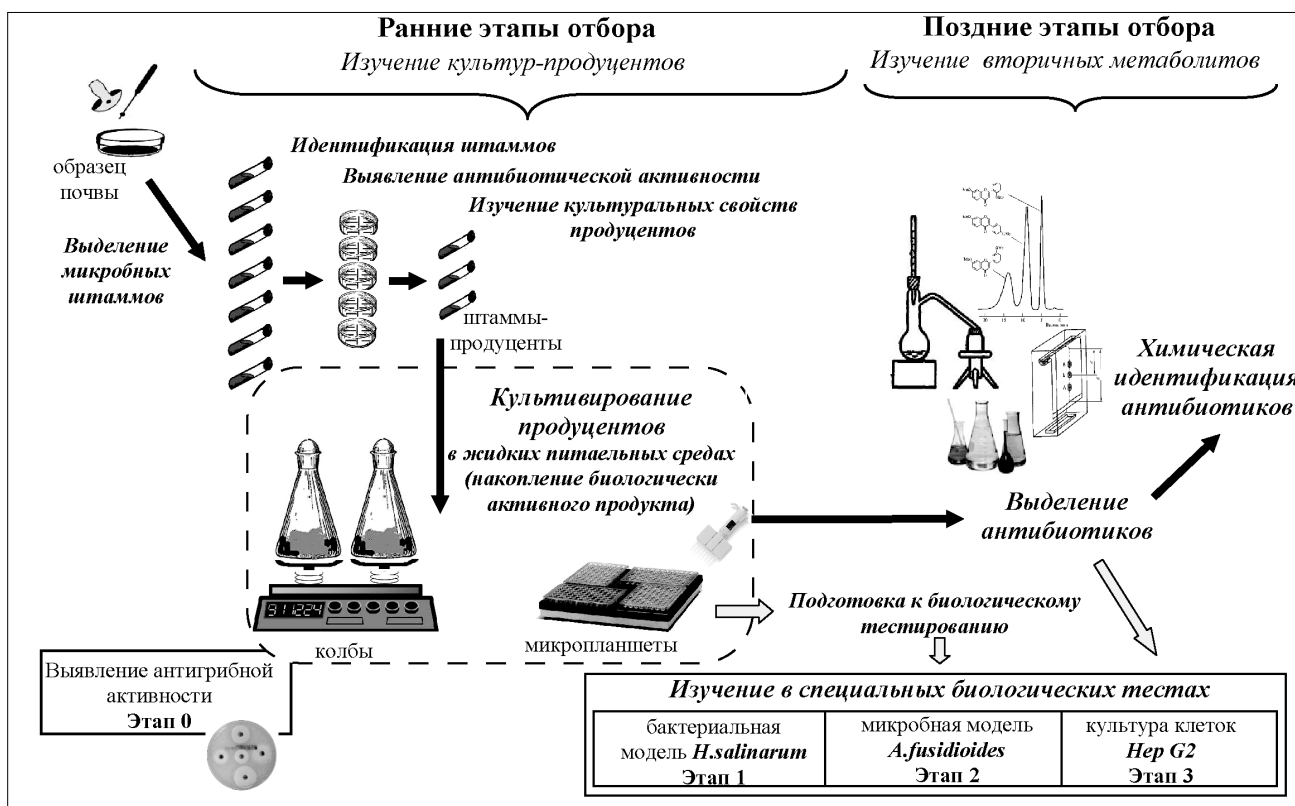


Рис. 4. Схема поиска штаммов-продуцентов ИБС.

па (этап 0) (рис. 3), основанного на выявлении у продуцентов противогрибковой активности и внесении в схему поиска ИБС соответствующих изменений (рис. 4).

Модели, необходимые для поиска ИБС, предложенные другими исследователями, весьма разнообразны. Такие антибиотики, как компактин и ловастатин (мевинолин), а также их производные правастатин и симвастатин были открыты как ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы с использованием модели, основанной на анализе подавляемой ими биохимической реакции [10, 11, 36].

Ингибитор ГМГ-КоА синтазы β -лактонный антибиотик 1233A был обнаружен при использовании другого подхода — в качестве основной модели его поиска была применена культура клеток млекопитающих линии Vero [37]. Антибиотик 1233A вызывал заметное подавление роста опухолевых клеток, однако, в отличие от противоопухолевых антибиотиков, переставал действовать при добавлении препарата экзогенной мевалоновой кислоты, что позволило выявлять ИБС, подавляющие ранние этапы биосинтеза ХС. Модель, основанная на использовании культуры клеток, продемонстрировала высокую пропускную способность, для выявления с её помощью антибиотика 1233A потребовалось проведение анализа 11 тыс. культур почвенных микроорганизмов.

Несколько иная модель поиска ИБС разработана на основе подавления роста дрожжевых культур, вызываемого компактином и его аналогами и

снимаемого в присутствии мевалоновой кислоты [38]. Отечественные исследователи для поиска ИБС применили штамм *Tolypocladium inflatum*, обладающий повышенной чувствительностью к ловастатину. О действии ИБС судили по подавлению в культуре биосинтеза эргостерола [19, 39].

В других исследованиях поиск ИБС микробного происхождения проводили с использованием чувствительной к ловастатину дрожжевой культуры *Rhodotorula rubra*. О наличии ИБС в экстрактах, полученных из культуральной жидкости и мицелия различных коллекционных микробных культур, судили по подавлению ими роста дрожжевой тест-культуры, а также по снижению содержания в её клетках эргостерола [40].

Используемая нами культура *H.salinarum*, в силу особенностей метаболизма архебактерий, обладает целым рядом важных преимуществ перед описываемыми моделями, в частности, высокой специфической чувствительностью к ингибиторам биосинтеза стеролов, а также простотой в использовании и возможностью визуальной оценки подавляющего действия отбираемых ингибиторов. Использование указанной модели в варианте с применением мевалоновой кислоты позволяет провести широкий поиск ингибиторов как ранних, так и поздних этапов биосинтеза стеролов.

Применение модели на ранней стадии поисковых исследований позволяет проводить одновременно отбор антибиотиков, обладающих противоопухолевым действием.

Сочетание указанной модели с другими специально разработанными моделями (*A.fusidioides* и Нер G2) дает возможность при проведении дальнейшего отбора с большей уверенностью судить о механизме действия отобранных соединений, их принадлежности к группе ИБС.

Применение культуры Нер G2 для поиска ингибиторов биосинтеза ХС, причём на ранних этапах отбора, было проведено также другими исследователями [19, 41]. Тестированию подвергали экстракты, полученные из мицелия микробных продуцентов — грибов, актиномицетов и эубактерий, выделенных из почвы. Отбор препаратов проводили в соответствии с их способностью к подавлению включения в ХС радиоактивного предшественника — ^3H -ацетата. В результате проведённой работы из 702 штаммов почвенных организмов удалось отобрать 25 штаммов, которые продуцировали соединения, ингибирующие синтез стеролов [18, 19].

Применяемая в нашей схеме отбора модель Нер G2 подразумевала использование в качестве радиоактивного предшественника ^{14}C -ацетата. Анализ подвергали не только экстракты, получаемые из мицелия свежесделенных из почвы продуцентов, но и экстракты, получаемые из их культуральной жидкости. Оценивали подавление биосинтеза не только ХС, но и других липидов, что позволило применять указанную модель как для отбора, так и для анализа механизма действия отбираемых соединений, их способности к подавлению биосинтеза липидов разных классов.

Модель Нер G2 была использована нами на поздних этапах отбора. Ранние этапы отбора в наших экспериментах связаны с использованием более простых, не требующих применения радиоизотопов, менее чувствительных к присутствию посторонних примесей микробных моделей.

Тот факт, что компактин и его аналоги обладают противогрибковым действием [38], был положен нами в основу тщательного анализа противогрибковой активности самих потенциальных штаммов-продуцентов. Отбор продуцентов, обладающих противогрибковой активностью, проводился на самых ранних этапах скрининговых исследований (рис. 3, 4). В целом, такой подход позволил резко повысить вероятность обнаружения ИБС.

Заключение

Таким образом, разработанные нами модели поиска ИБС оригинальны и принципиально отличаются от моделей поиска, предложенных другими исследователями [10, 19, 37–41]. Используемая нами культура *H.salinarum*, в силу особенностей метаболизма архебактерий, обладает целым рядом важных преимуществ, в частности, высокой чувствительностью к ИБС, а также простотой в использовании и возможностью визуальной оценки подавляющего действия от-

бираемых ингибиторов. Её сочетание с моделями *A.fusidioides* и Нер G2 дает возможность судить о механизме действия отбираемых соединений.

Скрининг, проведённый с помощью разработанной нами схемы поиска ИБС, включающей на начальном этапе обязательный отбор штаммов, обладающих противогрибковой активностью, показал, что способностью к продукции ИБС обладают различные микроорганизмы: не только несовершенные грибы, но также многие актиномицеты и отдельные представители высших базидиальных грибов [24–26, 42, 43].

Многие микроорганизмы образуют ингибиторы ранних этапов мевалонатного синтеза (вплоть до этапа работы ГМГ-КоА редуктазы включительно). Испытание таких метаболитов в микробных моделях (*H.salinarum*, *A.fusidioides*) показало, что их действие снимается при добавлении мевалоновой кислоты [25, 26]. Актиномицеты, обладающие такой способностью, прежде были неизвестны. Как показали результаты наших исследований, среди ИБС актиномицетного происхождения доля ингибиторов ранних этапов биосинтеза стеролов достигает 38%.

Препараты, выделенные в ходе поиска ИБС, относятся к разным классам химических соединений и могут быть условно разделены на три основные группы: линейные, циклические и поликонденсированные. Среди них такие антибиотики, как аскофуранон (199/89) [27], энниатин В (86/88) [28], антибиотики стероидной (55-А) и монаколиновой структуры (13/88-2) [26], хлоротрицин (1132/93) [29], а также обладающий высокой противогрибковой активностью антибиотик 1278 из группы ирумамицина [30].

Выводы

1. Предложена новая современная методология поиска микробных метаболитов — ИБС, обладающих гипополипидемическим и противогрибковым действием, основанная на использовании оригинальных тест-моделей — микроорганизмов *Acremonium fusidioides*, *Halobacterium salinarum* и культуры клеток гепатобластомы G2 с обязательным предварительным отбором на начальном этапе микробных метаболитов, обладающих противогрибковой активностью.

2. На основе созданной схемы изыскания ИБС проведён широкий поиск антибиотиков, обладающих гипополипидемическим и противогрибковым действием, среди различных штаммов грибов и актиномицетов. Установлено, что способностью к образованию ИБС обладают не только несовершенные грибы, но и актиномицеты. Выделены ИБС, принадлежащие к различным классам химических соединений. Изучен механизм действия препаратов, подавляющих как ранние (включая действие ГМГ-КоА редуктазы), так и поздние этапы биосинтеза стеролов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тренин А. С., Кампуха Г. С. Антибиотики — ингибиторы биосинтеза холестерина. Хим-фарм журн 1997; 31: 9: 5—16.
2. Тренин А. С. Вторичные метаболиты грибов — ингибиторы биосинтеза стеролов. Прикл биохим микробиол 1998; 34: 2: 131—138.
3. Trapani L., Segatto M., Pallottini V. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: the liver as a metabolic «power station». World J Hepatol 2012; 4: 6: 184—190.
4. Garcia-Ruiz C., Morales A., Fernandez-Checa J. C. Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy. Anticancer Agents Med Chem 2012; 12: 4: 303—315.
5. Seiki S., Frishman W. H. Pharmacologic inhibition of squalene synthase and other downstream enzymes of the cholesterol synthesis pathway: a new therapeutic approach to treatment of hypercholesterolemia. Cardiol Rev 2009; 17: 2: 70—76.
6. Belter A., Skupinska M., Giel-Pietraszek M. et al. Squalene monooxygenase — a target for hypercholesterolemic therapy. Biol Chem 2011; 392: 12: 1053—1075.
7. Kathiravan M. K., Salake A. B., Chothe A. S. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. Bioorg Med Chem. 2012; 20: 19: 5678—5698.
8. Hatori H., Sato B., Sato I. et al. FR901512, a novel HMG-CoA reductase inhibitor produced by an agonomycetous fungus No. 14919. II. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation and physico-chemical properties. J Antibiot (Tokyo) 2004; 57: 4: 264—270.
9. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P. et al. Antibiotic discovery in the twenty first century: current trends and future perspectives. J. Antibiot (Tokyo) 2010; 63: 8: 423—430.
10. Endo A., Monacolin K. A new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. J Antibiot (Tokyo) 1980; 33: 3: 334—336.
11. Alberts A. W., Chen J., Kuron G. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci U S A 1980; 77: 7: 3957—3961.
12. Iwasaki S., Omura S. Search for protein farnesyltransferase inhibitors of microbial origin: our strategy and results as well as the results obtained by other groups. J Antibiot (Tokyo) 2007; 60: 1: 1—12.
13. Brötz-Oesterhelt H., Sass P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. Future Microbiol 2010; 5: 10: 1553—1579.
14. Zanella F., Lorens J.B., Link W. High content screening: seeing is believing. Trends Biotechnol 2010; 28: 5: 237—245.
15. Сазыкин Ю. О., Бибикова М. В., Иванов В. П. и др. Технология скрининга вторичных микробных метаболитов: к эволюции методологии. Антибиотики и химиотер 2002; 47: 10: 25—31.
16. Koehn F. E. High impact technologies for natural products screening. Prog Drug Res 2008; 65: 177—210.
17. Moy T. I., Conery A. L., Larkins-Ford J. et al. High throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. ACS Chem Biol 2009; 4: 7: 527—533.
18. Бибикова М. В., Грамматикова Н. Э., Тертов В. В. и др. Отбор природных иммуносупрессоров по способности к модификации синтеза стеролов клетками гепатоцитов. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 8: 3—6.
19. Чмель Я. В., Бибикова М. В., Спиридонова И. А. и др. Скрининг природных соединений с гипополипидемической активностью. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 8—9: 8—12.
20. DeVito J. A., Mills J. A., Liu V. G. et al. An array of target-specific screening strains for antibacterial discovery. Nat Biotechnol 2002; 20: 5: 478—483.
21. Борисова Н. А., Чмель Я. В., Бибикова М. В., Катлинский А. В. Антимикробная активность природных гипополипидемических соединений. Антибиотики и химиотер 2005; 50: 12: 12—15.
22. Бибикова М. В., Грамматикова Н. Э., Катлинский А. В. и др. Влияние природных гипополипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas*. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 1—2: 10—13.
23. Hu Y., Shamaei-Tousi A., Liu Y., Coates A. A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: a novel topical antibiotic for staphylococcal infections. PLoS One 2010; 5: 7: e11818.
24. Тренин А. С., Терехова Л. П., Толстых И. В. и др. Отбор микробных вторичных метаболитов — ингибиторов биосинтеза холестерина с помощью культуры клеток гепатобластомы G2. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 3—8.
25. Тренин А. С. Микробная тест-система для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 3—4: 3—9.
26. Тренин А. С. Микробная модель *Halobacterium salinarum* для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 5—6: 3—10.
27. Терехова Л. П., Тренин А. С., Озерская С. М. и др. Образование аскофуранона культурой гриба *Paecilomyces variotii* Bainier 199. Микробиология 1997; 66: 5: 611—615.
28. Тренин А. С., Толстых И. В., Терехова Л. П. и др. Гипополипидемическое действие антибиотика 86/88 (эрниатина В) в культуре клеток гепатобластомы G2. Антибиотики и химиотер 2000; 45: 4: 6—9.
29. Терехова Л. П., Галатенко О. А., Тренин А. С. и др. Выделение и изучение антибиотика ИНА-1132 (хлоротрицина), образуемого штаммом *Streptomyces baarnensis*. Антибиотики и химиотер 2008; 53: 7—8: 3—7.
30. Shashkov A. S., Tsvetkov D. E., Lapchinskaya O. A. et al. Structure, ¹H and ¹³C NMR spectra, and biological activity of the antibiotic INA-1278 related to irumamycin and produced by the experimental *Streptomyces* sp. strain No. 1278. Russ Chem Bull Int Ed 2011; 60: 11: 2412—2417.
31. Duetz W. A., Witholt B. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. Biochem Eng J 2001; 7: 113—115.
32. Genilloud O., González I., Salazar O. et al. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. J Ind Microbiol Biotechnol 2011; 38: 3: 375—389.
33. Meletiadis J., Meis J. F., Mouton R. W., Verweij P. E. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. J Clin Microbiol 2001; 39: 2: 478—484.
34. Joubert A., Calmes B., Berruyer R. et al. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. Biotechniques 2010; 48: 5: 399—404.
35. Тренин А. С., Дудник Ю. В. Твердофазная система РНК-зависимой ДНК-полимеразы в поиске антибиотиков — потенциальных ингибиторов ВИЧ. Антибиотики и химиотер 2005; 50: 10—11: 4—12.
36. Endo A., Kuroda M., Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. J Antibiot (Tokyo) 1976; 29: 12: 1346—1348.
37. Kumagai H., Tomoda H., Omura S. Method of search for microbial inhibitors of mevalonate biosynthesis using animal cells. J Antibiot (Tokyo) 1990; 43: 4: 397—402.
38. Ikeura R., Murakawa S., Endo A. Growth inhibition of yeast by compactin (ML-236B) analogues. J Antibiot (Tokyo) 1988; 41: 8: 1148—1150.
39. Бибикова М. В., Чмель Я. В., Спиридонова И. А., Катлинский А. В. Влияние ловастатина на рост и образование эргостерола культурой *Tolypocladium inflatum* 106. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 4: 3—6.
40. Баранова Н. А., Крейер В. Г., Ландау Н. С., Егоров Н. С. Метаболиты микромикетов — ингибиторы роста и биосинтеза стероидов у дрожжей. Антибиотики и химиотер 2002; 47: 1: 3—6.
41. Чмель Я. В., Бибикова М. В., Долгова Г. В. и др. Оценка эффективности отобранных природных гипополипидемических веществ на модели гиперхолестеринемии у кроликов. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 11: 3—6.
42. Тренин А. С., Цвигун Е. А., Соболева Н. Ю. и др. Антимикробная и гипополипидемическая активность штаммов *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum*. Иммунопатология, аллергология, инфектология: Труды междисциплинарного форума: Грибные биотехнологии в медицине и промышленности. 2010; 1: 270.
43. Trenin A. S., Lapchinskaya O. A., Pogozheva V. V. et al. Antifungal activity of natural compounds produced by mutant strains of *Amycolatopsis orientalis* subsp. *eremomycini* and *Streptoallelefeichus cremeus* subsp. *tobramycini*. Abstr 7th Int. Congress «Biotechnology: State of the Art and prospects of development». M.: 2013; 1: 74.

Особенности антибактериальной терапии новорождённых с полиорганной недостаточностью

Е. Н. СЕРЕБРЯКОВА, Д. К. ВОЛОСНИКОВ, Г. А. ГЛАЗЫРИНА

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск

Characteristics of Antibiotic Therapy in Neonates with Polyorgan Insufficiency

E. N. SEREBRYAKOVA, D. K. VOLOSNIKOV, G. A. GLAZYRINA

South Ural State Medical University, Chelyabinsk

Полиорганная недостаточность (ПОН) является основной причиной смерти пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Самые высокие показатели заболеваемости и смертности от ПОН отмечаются у новорождённых детей. Назначение антибактериальной терапии по поводу вероятного инфекционного процесса широко распространено в неонатологии, однако длительная антибактериальная терапия имеет ряд неблагоприятных последствий для новорождённых. Цель настоящего исследования — изучить особенности антибактериальной терапии у новорождённых с ПОН. В исследование включено 453 новорождённых ребенка с ПОН. Антибактериальную терапию получали 100% новорождённых, включённых в исследование. Цефалоспорины III—IV поколения и аминогликозиды были наиболее часто назначаемыми препаратами. При тяжёлом течении ПОН антибактериальная терапия является более интенсивной и длительной, наиболее продолжительно терапию получают новорождённые с массой тела при рождении менее 1500 г. Критерием для отмены антибактериальной терапии у новорождённых с ПОН является восстановление органных функций. Антибактериальная терапия у новорождённых с ПОН требует оптимизации.

Ключевые слова: новорождённые, полиорганная недостаточность, антибактериальная терапия

Polyorgan insufficiency (POI) is the main cause of death in ISU patients. The highest rates of morbidity and mortality due to POI are recorded among newborns. Antibacterial therapy of probable infections processes is widely used in neonatology, however long-term antibacterial therapy is not favourable for newborn infants. The aim of the present study was to investigate the peculiarities of antibacterial therapy in newborn with POI. The trial enrolled 453 infants antibacterial therapy was used in all of them (100%). The most frequent drugs used in the treatment were the III and IV generation cephalosporines and aminoglycosides. The POI antibacterial therapy in severe cases was more intensive and prolonged. The most long-term therapy was applied to newborns weighting 1500 g. Recovery of the organ function served as a criterion for discontinuation of the antibacterial therapy. Antibacterial of neonate infants with POI requires optimization.

Keywords: neonates, polyorgan insufficiency, antibacterial therapy.

Введение

Полиорганная недостаточность (ПОН) является основной причиной смерти пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [1, 2]. При поступлении в ОРИТ ПОН у детей раннего возраста встречается значительно чаще, чем у детей других возрастных групп [3, 4]. Самые высокие показатели заболеваемости и смертности от ПОН имеют место у новорождённых детей. Недоношенные дети в большей степени предрасположены к развитию ПОН, чем доношенные. ПОН является одной из самых актуальных проблем в неонатологии [5—7]. Наиболее частыми причинами ПОН у новорождённых являются респираторный

дистресс синдром, асфиксия, сепсис [5—8]. В связи с высокой вероятностью системной инфекции с неблагоприятным исходом у новорождённых, неспецифичностью клинических симптомов и отсутствием до настоящего времени лабораторных критериев, позволяющих с высокой вероятностью исключить или подтвердить наличие системной инфекции у новорождённого, назначение антибактериальной терапии по поводу вероятного инфекционного процесса широко распространено в неонатологии [9]. В то же время в ряде работ показано, что длительная антибактериальная терапия увеличивает риск развития у новорождённых язвенно-некротического энтероколита и позднего неонатального сепсиса, значительно увеличивает стоимость лечения новорождённых и способствует формированию резистентности микрофлоры к антибиотикам [10].

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64. ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России»

В последние годы вопрос назначения антибактериальной терапии новорожденным с профилактической целью является дискуссионным, рекомендовано сокращать длительность антибактериальной терапии и назначать новорожденным антибактериальные препараты узкого спектра действия, подчеркивается необходимость оптимизации антибактериальной терапии у новорожденных [11, 12]. В работе М. А. Немелс и соавт. [13] показано, что антибактериальная терапия неонатального сепсиса, вызванного коагулазонегативными стафилококками, длительностью 3 суток так же эффективна, как и в течение 7 суток.

Цель настоящего исследования — изучить особенности антибактериальной терапии у новорожденных с ПОН.

Материал и методы

Исследование проведено на базе Челябинской областной детской клинической больницы, (ЧОДКБ) отделений реанимации и интенсивной терапии № 1 и № 2, педиатрического отделения для новорожденных детей.

В исследование включено 453 новорожденных ребенка в раннем неонатальном периоде, поступивших с января 2009 года по май 2011 года в отделения реанимации и интенсивной терапии ЧОДКБ. Недостаточность двух и более систем органов на момент поступления в отделение реанимации являлась критерием для включения в исследование. Критериями исключения из исследования были наличие у новорожденного хромосомных аномалий, пребывание новорожденного в ЧОДКБ менее 48 часов.

Для оценки тяжести ПОН включенные в исследование новорожденные ежедневно оценивались по шкале NEOMOD, предложенной для оценки тяжести ПОН у новорожденных [14]. Новорожденные ($n=175$) с максимальной оценкой по шкале NEOMOD в раннем неонатальном периоде 4 и менее баллов (умеренные проявления СПОН) составили первую группу. Новорожденные ($n=197$) с максимальной оценкой в раннем неонатальном периоде 5 и более баллов (тяжелые проявления СПОН) составили вторую группу. Новорожденные с летальным исходом за период наблюдения ($n=81$) составили третью группу.

Статистический анализ проведен с использованием непараметрических методов — двухстороннего теста Фишера, метода χ^2 , теста Манна–Уитни, теста Краскела–Уоллиса. Количественные данные представлены в формате Ме (медиана), интерквартильный размах — UQ–LQ (25%–75% процентиля).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлено распределение обследованных новорожденных в группах по полу, гестационному возрасту, массе при рождении, максимальной оценке по шкале NEOMOD в раннем неонатальном периоде.

Как показано в табл. 1, новорожденные в группах сопоставимы по полу, имеют место различия в

массе при рождении и сроку гестации. При попарном сравнении групп выявлено, что первая и вторая группы (выжившие новорожденные) сопоставимы по массе при рождении ($p=0,4$) и гестационному возрасту ($p=0,3$). В третьей группе (умершие новорожденные) имеются статистически значимые различия по массе при рождении ($p<0,001$) и гестационному возрасту ($p=0,005$) в сравнении с выжившими новорожденными (первая и вторая группы). Среди умерших новорожденных (третья группа) недоношенность имела место в 62 (76,5%) случаев, среди выживших новорожденных (первая и вторая группы) — 235 (63,2%) случаев, различия статистически значимы ($p=0,03$), то есть доля недоношенных новорожденных среди умерших выше, чем среди выживших, в целом среди обследованных новорожденных преобладали недоношенные дети. Имеют место статистически значимые различия в максимальной оценке по шкале NEOMOD при попарном сравнении между первой и второй группами ($p<0,001$) и первой и третьей группами ($p<0,001$). Статистически значимых различий в максимальной оценке по шкале NEOMOD в раннем неонатальном периоде между второй группой и третьей группой не выявлено ($p=0,2$), то есть группы новорожденных с тяжелыми проявлениями ПОН и с летальным исходом в раннем неонатальном периоде были сопоставимы по тяжести состояния, умершие новорожденные имели тяжелые проявления ПОН в раннем неонатальном периоде.

Асфиксия как этиологический фактор ПОН имела место у 281 (62%) новорожденного, в том числе у 97 (55,4%) новорожденных в первой группе, у 126 (64%) новорожденных во второй группе, у 58 (71,6%) новорожденных в третьей группе, $p=0,04$. При попарном сравнении групп получены статистически значимые различия между первой группой и третьей группой ($p=0,02$). Различия между первой группой и второй группой ($p=0,1$) и различия между второй группой и третьей группой ($p=0,3$) статистически не значимы.

Респираторный дистресс-синдром как этиологический фактор ПОН имел место у 387 (85,4%) новорожденных, в том числе у 124 (71,9%) новорожденных в первой группе, у 180 (92,4%) во второй группе, у 81 (100%) новорожденных в третьей группе, $p<0,001$. При попарном сравнении групп получены статистически значимые различия между первой группой и третьей группой ($p<0,001$), между первой группой и вто-

Таблица 1. Распределение обследованных новорожденных по группам

Параметры	Первая группа, $n=175$	Вторая группа, $n=197$	Третья группа, $n=81$	p
Мальчики/девочки	101/74	118/79	50/21	0,8
Гестационный возраст, нед	35 (32–38)	34 (31–38)	32 (30–36)	0,01
Масса при рождении, г	2200 (1660–3100)	2160 (1580–2990)	1780 (1400–2400)	0,002
Оценка по шкале NEOMOD	4 (3–4)	6 (5–6)	6 (5–7)	$p<0,001$

Таблица 2. Динамика показателей у выживших новорождённых

Показатели	Первая группа, n=175	Вторая группа, n=197	p
Длительность респираторной поддержки, сутки	5 (1—11)	13 (8—19)	<0,001
Длительность полного парентерального питания, сутки	2 (1—4)	6 (4—10)	<0,001
Длительность инотропной поддержки, сутки	4 (0—8)	9 (5—15)	<0,001
Переход на полное энтеральное питание, сутки	16 (10—23)	25 (18—31)	<0,001
Потребность в кислородной поддержке, сутки	15 (9—22)	24 (15—34)	<0,001
Прибавка в массе тела на 28-е сутки	290 (200—400)	170 (100—280)	<0,001

рой группой ($p<0,001$), между второй группой и третьей группой ($p=0,007$).

Неонатальный сепсис в качестве этиологического фактора ПОН был установлен у 126 (26,8%) из обследованных новорождённых, в том числе в первой группе у 9 (5,1%) новорождённых, во второй группе у 80 (40,6%) новорождённых, в третьей группе у 37 (45,7%) новорождённых, различия в группах статистически значимы ($p<0,001$). При попарном сравнении групп получены статистически значимые различия между первой группой и второй группой ($p<0,001$), между первой группой и третьей группой ($p<0,001$), статистически значимых различий по частоте неонатального сепсиса между второй группой и третьей группой не получено ($p=0,5$).

Активация системного воспалительного ответа в результате перенесённой асфиксии, развития тяжёлого респираторного дистресс-синдрома и сепсиса приводит к развитию ПОН у новорождённых, не имеющей клинических различий в зависимости от генеза [15].

Летальность среди обследованных новорождённых составила 17,9%. Медиана возраста, в котором наступил летальный исход в группе умерших новорождённых, равна 17 (10—31) суткам, то есть у половины новорождённых смертельный исход наступил между 10-ми и 31-ми сутками жизни. В структуре патологоанатомического диагноза в качестве первоначальной причины смерти наиболее часто был указан респираторный дистресс-синдром — в 31 (38%) случаев.

В табл. 2 представлены длительность органических дисфункций, время перехода на энтеральное питание в полном объёме и прибавка в массе тела на 28 суток жизни у выживших новорождённых.

В табл. 2 показано, что длительность органических дисфункций у новорождённых с умеренными проявлениями СПОН в раннем неонатальном периоде значительно меньше, чем у новорождённых с тяжёлыми проявлениями СПОН в раннем неонатальном периоде. Время перехода на энтеральное питание в полном объёме по срокам сильно коррелирует с длительностью зависимости от кислорода (коэффициент Спирмена 0,77, $p<0,001$). Прибавка в массе тела за неонатальный период как интегральный показатель оптимального функционирования органов и систем выше в группе новорождённых с

умеренными проявлениями СПОН в раннем неонатальном периоде.

Антибактериальную терапию получали 453 (100%) новорождённых, включённых в исследование. Эмпирический подбор антибактериальной терапии у обследованных новорождённых осуществлялся до получения результатов определения чувствительности микрофлоры к антибиотикам, далее подбор антибактериальных препаратов проводился с учётом чувствительности к антибиотикам микрофлоры, полученной при проведении бактериологических посевов с кожи, слизистых оболочек, аспирата трахеобронхиального дерева, крови, мочи, кала, ликвора обследованных новорождённых. Антибактериальная терапия была назначена в раннем неонатальном периоде в 100% случаев, в том числе у 432 (95,4%) новорождённых антибактериальная терапия была назначена в первые сутки жизни. Препараты цефалоспоринового ряда (цефалоспорины III—IV поколения) получали 453 (100%) обследованных новорождённых, среднее количество препаратов цефалоспоринового ряда, назначенных каждому из обследованных новорождённых, составило 2 (1—3). Препараты из группы аминогликозидов получали 403 (89%) обследованных новорождённых, в том числе 58 (12,8%) новорождённых получили 2 препарата из группы аминогликозидов. Препараты из группы гликопептидов получили 127 (28%) новорождённых, препараты из группы карбапенемов — 99 (21,9%) новорождённых, в том числе 10 (2,2%) новорождённых получили 2 препарата из группы карбапенемов. Препараты из группы макролидов получили 65 (14,6%), препараты из группы фторхинолонов — 63 (13,9%) новорождённых. Метронидазол, препарат из группы нитроимидазолов, получили 117 (25,8%) новорождённых. Противогрибковый препарат из группы триазолов — флюконазол получили 269 (59,4%) новорождённых. Среднее общее количество назначенных антибактериальных препаратов для каждого новорождённого составило 5 (3—6).

Сравнение по количеству и частоте назначения антибактериальных препаратов и длительности антибактериальной терапии проведено среди выживших новорождённых — между первой группой и второй группой (табл. 3), новорождённых с летальным исходом (третья группа) в подобный анализ не включали, так как количество,

Таблица 3. Количество, частота назначения антибактериальных препаратов и длительность антибактериальной терапии у выживших новорождённых со СПОН

Группы антибактериальных препаратов	Первая группа, n=175	Вторая группа, n=197	p
Цефалоспорины, количество	2 (1—2)	2 (2—3)	<0,001
Аминогликозиды, абс (%)	131 (74,3)	181 (91,9)	<0,001
Гликопептиды, абс (%)	24 (13,7)	76 (38,6)	<0,001
Карбопенемы, абс (%)	15 (8,6)	60 (30,5)	<0,001
Макролиды, абс (%)	22 (12,6)	39 (19,8)	0,07
Фторхинолоны, абс (%)	10 (5,7)	40 (20,3)	<0,001
Метронидазол, абс (%)	20 (11,4)	77 (39,1)	<0,001
Флуконазол, абс (%)	79 (45,1)	138 (70,1)	<0,001
Общее количество антибактериальных препаратов	3 (2—5)	6 (4—7)	<0,001
Длительность антибактериальной терапии, сутки	25 (18—34)	30 (26—40)	<0,001

Таблица 4. Корреляционные связи длительности антибактериальной терапии с другими показателями у выживших новорождённых со СПОН

Показатели	Коэффициент Спирмена	p
Длительность антибактериальной терапии и масса тела при рождении	-0,42	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и срок гестации	-0,38	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и оценка по шкале Апгар на 1'	-0,24	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и оценка по шкале Апгар на 5'	-0,27	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и оценка по шкале NEOMOD	0,38	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и длительность полного парентерального питания	0,41	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и длительность инотропной поддержки	0,44	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и длительность респираторной поддержки	0,65	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и возраст перехода на полное энтеральное питание	0,7	<0,001
Длительность антибактериальной терапии и потребность в оксигенотерапии	0,77	<0,001

частота назначения антибактериальных препаратов и длительность антибактериальной терапии в данной группе непосредственно связаны со временем наступления летального исхода.

Как показано в таблице 3, в группе новорождённых с тяжёлыми проявлениями СПОН в раннем неонатальном периоде антибактериальная терапия была более интенсивной и длительной, значительно чаще назначались антибактериальные препараты, общее количество назначенных каждому ребёнку антибактериальных препаратов и препаратов цефалоспоринового ряда выше в группе новорождённых с тяжёлыми проявлениями СПОН в раннем неонатальном периоде.

Корреляционные связи длительности антибактериальной терапии с массой тела при рождении и сроком гестации, оценкой по шкале Апгар, NEOMOD, длительностью респираторной поддержки и потребности в кислороде у выживших новорождённых со СПОН (n=372) представлены в табл. 4.

Как показано в табл. 4, имеет место статистически значимая слабая корреляция длительности антибактериальной терапии с оценкой по шкале Апгар на 1-й минуте, умеренная — с оценкой по шкале Апгар на 5-й минуте, массой при рождении, сроком гестации, оценкой по шкале NEOMOD, длительностью парентерального питания, респираторной и инотропной поддержки, временем перехода на полное парентеральное питание, и высокая корреляция с длительностью потребности в кислороде, то

есть время отмены антибактериальной терапии связано со сроками восстановления функций органов и систем, более длительно антибактериальная терапия проводилась у новорождённых с высокой степенью незрелости. Так, длительность антибактериальной терапии у выживших новорождённых с массой тела при рождении менее 1500 г при рождении (n=68) составила 40 (28—50) суток.

Заключение

Антибактериальная терапия назначается в каждом случае ПОН у новорождённых, так как ПОН инфекционного и неинфекционного генеза клинических различий не имеет. Цефалоспорины III—IV поколения и аминогликозиды являются наиболее часто назначаемыми антибактериальными препаратами у новорождённых с ПОН, широко назначается противогрибковая терапия с использованием флуконазола. При тяжёлом течении ПОН антибактериальная терапия является более интенсивной и длительной, наиболее продолжительную антибактериальную терапию получают новорождённые с массой тела при рождении менее 1500 г. Критерием для отмены антибактериальной терапии у новорождённых с ПОН является восстановление органных функций.

Антибактериальная терапия у новорождённых с ПОН требует оптимизации, учитывая неблагоприятные последствия длительной антибактериальной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зильбер А.П. Этюды критической медицины. М.: 2006; 568.
2. Barie P. S., Hydo L. J., Shou J., Eachempati S. R. Decreasing magnitude of multiple organ dysfunction syndrome despite increasingly severe critical surgical illness: a 17-year longitudinal study. *J Trauma* 2008 Dec; 65: 6: 1227—1235.
3. Typpo K. V., Petersen N. J., Hallman D. M., Markovitz B. P., Mariscalco M. M. Day 1 multiple organ dysfunction syndrome is associated with poor functional outcome and mortality in the pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2009 Sep; 10: 5: 562—570.
4. Jaramillo-Bustamante J. C., Marin-Agudelo A., Fernandez-Laverde M., Bareno-Silva J. Epidemiology of sepsis in pediatric intensive care units: First Colombian Multicenter Study. *Pediatr Crit Care Med* 2012 Sep; 13: 5: 501—508.
5. Александрович Ю. С., Нурмагамбетова Б. К., Пишенисов К. В., Паршин Е. В. Особенности течения синдрома полиорганной недостаточности у доношенных и недоношенных новорождённых. *Вопр практ педиатр* 2009; 4: 1: 14—16.
6. Bestati N., Leteurtre S., Duhamel A., Prolux F., Grandbastien B., Lacroix J., Leclerc F. Differences in organ dysfunctions between neonates and older children: a prospective, observational, multicenter study. *Crit Care* 2010; 14: 6: R202.
7. Faa G., Fanni D., Gerosa C., Nemolato S., Faa A., Obinu E., Puxeddu E., Frascini M., Iacovidou N., Zaffanello M., Fanos V. Multiple organ failure syndrome in the newborn: morphological and immunohistochemical data. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012 Oct; 25: Suppl 5: 68—71.
8. Liu J. X., Xiong T., Feng H., Qu Y., Ye Q. H., Mu D. Z. Risk factors of post-asphyxial multiple organ dysfunction in neonates. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2011 Dec; 13: 12: 940—943.
9. Hofer N., Zacharias E., Muller W., Resch B. An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks. *Neonatology* 2012; 102: 1: 25—36.
10. Tziella C., Borghesi A., Perotti G. F., Garofoli F., Manzoni P., Stronati M. Use and misuse of antibiotics in the neonatal intensive care unit. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012 Oct; 25: Suppl 4: 35—37.
11. Tripathi N., Cotten C. M., Smith P. B. Antibiotic use and misuse in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol* 2012 Mar; 39: 1: 61—68.
12. Stocker M., Ferrao E., Banya W., Cheong J., Macrae D., Furck A. Antibiotic surveillance on a paediatric intensive care unit: easy attainable strategy at low costs and resources. *BMC Pediatr* 2012 Dec 21; 12: 196.
13. Hemels M. A., van den Hoogen A., Verboon-Macielek M. A., Fleer A., Krediet T. G. Shortening the antibiotic course for the treatment of neonatal coagulase-negative staphylococcal sepsis: fine with three days? *Neonatology* 2012; 101: 2: 101-105.
14. Janota J., Simak J., Stranak Z., Matthews T., Clarke T., Corcoran D. Critically ill newborns with multiple organ dysfunction: assessment by NEOMOD score in a tertiary NICU. *Ir J Med Sci* 2008 Mar; 177: 1: 11—17.
15. Неонатология: учеб. пособие: в 2 т. / Н.П. Шабалов. М.: 2004; 1: 680.

Циклоферон как средство противорецидивной терапии больных хроническим гиперпластическим синуситом

И. П. ВАСИЛЕНКО¹, М. Г. РОМАНЦОВ², А. И. КРЮКОВ³, С. С. ГРИГОРЯН¹, А. Л. КОВАЛЕНКО²

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва

² ООО «Научно-технологическая фармацевтическая фирма «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

³ Московский НИИ уха, горла и носа МЗ РФ

Cycloferon as an Agents of Antirelapsing Therapy in Patients with Chronic Hyperplastic Sinusitis

I. P. VASILENKO, M. G. ROMANTSOV, A. I. KRUKOV, S. S. GRIGORYAN, A. L. KOVALENKO

N.F.Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Polysan Co, St.Petersburg

Moscow Research Institute of Otorhinolaryngology, Moscow

В статье представлен материал по эффективности циклоферона как средства противорецидивной терапии 123 больных хроническим гиперпластическим синуситом. Лекарственная индукция эндогенных интерферонов обоснована особенностями местного мукозального иммунитета, вирусной инвазией и персистенцией вирусов в слизистой оболочке полости носа и околоносовых пазухах, а также различной степенью дефицита продукции интерферона. Показана клиническая эффективность у 53% больных, рецидивирование заболевания наблюдали лишь в 13,1% случаев у получавших циклоферон против 33,3% пациентов, находившихся на местной кортикостероидной терапии.

Ключевые слова: хронический гиперпластический синусит, циклоферон, противорецидивное лечение, интерфероновый ответ.

The data on the efficacy of cycloferon as an agents of antirelapsing therapy in management of 123 patients with chronic hyperplastic sinusitis are presented. The drug induction of endogenous interferons was validated by the properties of the local mucosal immunity, virus invasion and virus persistence in the nasal and accessory nasal sinuses mucosa, as well as by different levels of the interferon production deficiency. The clinical efficacy was stated in 53% of the cases. The relapses were recorded in 13.1% of the patients treated with cycloferon vs. 33.3% of the patients under the local corticosteroid therapy.

Key words: chronic hyperplastic sinusitis, cycloferon, antirelapsing therapy, interferon response.

Занимая лидирующее место в структуре заболеваний верхних дыхательных путей, хронические синуситы выявляются у 5—10% населения, при этом наиболее неблагоприятной формой воспалительных заболеваний околоносовых пазух является хронический гиперпластический синусит, распространённость которого составляет 1,1% среди заболеваний ЛОР-органов, а показатель рецидивирования гиперпластического синусита достигает 60% [1—3].

Распространённым методом терапии полипозного синусита является хирургическое лечение с последующим курсом противорецидивной терапии, при этом в качестве препаратов используются иммуномодуляторы и топические глюкокортикоиды [4—6].

Учитывая значимую роль в течении полипозного синусита местного мукозального иммуните-

та, вирусную инвазию и персистенцию вирусов в слизистой оболочке полости носа и околоносовых пазухах, становится очевидным несовершенство местной кортикостероидной терапии. Эпителий слизистой оболочки верхних дыхательных путей в комплексе с интраэпителиальными лимфоцитами являются основной структурной зоной, где осуществляется иммунологическая регуляция [7—10]. В связи с этим важное место отводится интерферонам (цитокинам), выполняющим роль кооперации клеток, участвующих в иммунном ответе. Принимая во внимание роль вирусной инвазии и персистенции вирусов в качестве триггерного механизма в развитии гиперпластического синусита и возможного возникновения неопластического процесса [11—12], представляется целесообразным изучение эффективности индукторов интерферона (в частности циклоферона) в противорецидивном лечении хронического полипозного синусита.

Лекарственная индукция интерферонов, в условиях развивающегося блока противовирусного

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18. НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

действия интерферонов, поддерживает клеточную защиту, делая её эффективной против активно развивающейся инфекции. Основными факторами защиты клеток при лекарственной индукции интерферонов 1-го типа является активация дс-РНК-зависимой протеинкиназы, олигоаденилат-синтетазы и РНКазы L и синтез Мх белка, блокирующего активность вирусспецифической РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Ранний индуктор интерферона 1-го типа, на основе акридонуксусной кислоты (циклоферон) адресно транспортируются в клеточное ядро, увеличивая время пребывания препарата в клетках, повышая интерферониндуцирующую активность. Препарат запускает каскад реакций, приводящий к усилению синтеза интерферона, концентрация которого нарастает от 2 до 8 часов, превышая исходный уровень в 2,6–4 раза. Транскрипция гена мРНК интерферона-альфа уже к 6 часам от начала воздействия достигает максимума, превышая фоновый уровень в 29–44 раза, указывая, что индукция гена мРНК-ИФН есть первичный ответ клеток моноцитарной линии. Циклоферон, снижая эффект вирусиндуцированного блокирования синтеза собственных белков клетки на стадии внутриядерной сборки вирусных капсидов, блокирует инкорпорацию вирусной ДНК в пресформированные капсиды, а на поздней стадии репликативного цикла вируса препятствует «одеванию» вирусных капсидов в липопротеидную оболочку и выходу вирусного потомства [13–14].

Целью исследования — оценка эффективности терапии, включающей циклоферон в комплексное противорецидивное лечение, в сочетании с хирургическим вмешательством для повышения эффективности проводимого лечения.

Материал и методы

Под наблюдением находились 123 пациента с хроническим полипозным синуситом в возрасте от 15 до 76 лет, среди них 51 (41,6%) мужчина и 72 (58,4%) женщины, большую часть наблюдаемых пациентов — 101 (83,2%) больной составили лица трудоспособного возраста (от 20 до 60 лет). 78 (63,4%) пациентов отмечали в анамнезе простудные заболевания, связывая их с гриппом и ОРВИ, обострением герпетической инфекции. 35 больных в качестве первопричины заболевания выделяли установленную и подтверждённую аллергию на медикаменты (70%), продукты питания (13,3%) и бытовые аллергены (5,6%). Длительность заболевания колебалась от 2 до 10 лет у 71,2%, от 10 до 20 лет и более у 28,8% больных. Рецидивирующий характер полипозного процесса обусловил деление больных на две основные группы: 1-я группа включала 43 пациента (35%) с первично-выявленным полипозным процессом; 2-я группа — 80 пациентов (65%) с рецидивирующим полипозным синуситом.

Все эти больные ранее получали антибактериальную, гипосенсибилизирующую терапию, гормональное и физиотерапевтическое лечение, перенесли однократную и повторные (до 7 раз) политомию носа и подслизистую резекцию носовой перегородки (6 случаев), нижнюю конхотомию — 16 случаев, гайморотомию и операции по Калдвелл–Люкку (20 пациентов).

По частоте рецидивов среди больных с рецидивирующим полипозным синуситом выделены группы больных до 2 лет — 21 (26,3%) пациент, от 2 до 5 лет — 18 (22,5%) пациентов, от 5 до 10 лет — 30 пациентов (37,5%), от 10 и более лет — 11 пациентов (13,7%). Из основных клинических симптомов доминировало затруднение носового дыхания (90,7% — 111 пациентов); выделения из носоглотки слизистого и слизисто-гнойного характера беспокоили 99 (80,5%) больных, нарушение обоняния отмечали 90 (73,1%) больных. Хронические неспецифические заболевания лёгких выявлены у 32 (25,9%) больных, хронический обструктивный бронхит у 9,3%, бронхиальная астма — у 16,7%. Описанная клиническая группа больных хроническим полипозным синуситом характеризовалась незначительной ранее проведённой эффективностью консервативного и оперативного лечения.

Разработана тематическая карта, заполнявшаяся на каждого больного, где фиксировались паспортные, анамнестические, общеклинические данные, подробные результаты функционального обследования, лабораторные данные.

Осмотр ЛОР-органов начинали с лицевого скелета и оценки состояния наружного носа, далее переходили к задней риноскопии, при которой оценивали расположение носовой перегородки, состояние слизистой оболочки, наличие, характер выделений и их локализация, состояние нижней и средних носовых раковин, наличие и локализация полипозных вегетаций, степень распространённости полипозного процесса.

Для эндоскопического обследования полости носа использовали набор жёстких эндоскопов системы Hopkins с углом зрения 0 и 300 диаметром 2,7 и 4 мм.

Оценку всасывательной и выделительной функций мерцательного эпителия слизистой оболочки носа осуществляли изучением транспортной функции с помощью полимерной водорастворимой плёнки из оксипропилметилцеллюлозы [15].

Исследование обонятельной функции полости носа проводили методом В. И. Воячека, используя стандартный набор пахучих веществ [16].

Дыхательную функцию оценивали, используя компьютерный ринопневмометр для выполнения активной риноманометрии «Rhinospir-164».

Рентгенография околоносовых пазух проводилась по Я. А. Фаустовскому, что дало возможность оценить состояние клеток решётчатого лабиринта. Высокоинформативным методом в оценке состояния полости носа и околоносовых пазух, степени распространённости патологического процесса и для определения объёма хирургического вмешательства являлась компьютерная томография (использован томограф «SitiMax») полости носа и околоносовых пазух [17].

Интраоперационный материал подвергался гистологическому исследованию. Особое внимание уделяли типу клеточной инфильтрации, степени воспалительной реакции, наличию фиброзного процесса, количеству желёз и состоянию мерцательного эпителия, степени его дисплазии.

Оценку состояния системы интерферона проводили по методике С. С. Григорян и др., позволяющей оценить количественные параметры интерфероновой реакции [18].

В работе использован циклоферон — отечественный индуктор интерферона, препарат индуцирует синтез раннего интерферона макрофагами, нейтрофилами, В-лимфоцитами с максимальной продукцией к 8 часам и длительностью действия в течение 24 часов. Препарат не обладает пирогенностью, аллергенностью, не вызывает аутоиммунных процессов, хорошо сочетается с традиционными терапевтическими лекарственными средствами. Циклоферон быстро проникает в кровь, хорошо диффундирует в биологические жидкости, выводится почками в неизменном виде в течение 24 часов.

Использован раствор циклоферона 125 мг/мл при интрамуккозном введении по точкам остеоментального комплекса (на 1-2-4-6-8-10-12-14 дни), далее введение 3 раза в неделю до достижения стабильной коррекции дефицита α -ИФН и γ -ИФН. Аппликации линимента 5% циклоферона в послеоперационные

Таблица 1. Исходный уровень показателей ИФН-статуса у наблюдаемых больных

Субтипы ИФН	Норма показателей, ед/мл	Степень выраженности изменений, число больных (абс. ч/%)			
		I	II	III	IV
1-я группа (первичный полипозный синусит), n=43					
ИФН-альфа	640,0±32 608—672	14/32,5	20/46,5	7/16,3	2/4,6
ИФН-гамма	64,0±16,0 48—80	—	34/79,0	9/21,0	—
2-я группа (рецидивирующий полипозный синусит), n=80					
ИФН-альфа	640,0±32 608—672	16/20,5	46/57,5	18/22,5	—
ИФН-гамма	64,0±16,0 48—80	—	25/31,2	43/53,8	12/15,0

полости проводились, начиная со стадии образования кровяного сгустка (по W. Hosemann, 1991) в раннем послеоперационном периоде в течение 12—16 недель до окончания процессов мезенхимальной перестройки.

Для уточнения влияния циклоферона на цитокиновый профиль проведено исследование спектра циклоферон-индуцированных цитокинов на основе выявления иРНК для цитокинов в человеческих перевиваемых клеточных линиях иммунного и неиммунного происхождения. В результате установлено, что циклоферон является индуктором смешанного Th2/Th1 иммунного ответа [13—14].

Статистическая обработка проводилась после проверки данных на нормальное распределение с помощью теста Шапиро—Уилка. Для обработки количественных признаков использовался *t*-критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

I стадия распространённости полипозного процесса выявлена у 16,3%, II стадия — у 26%, III стадия — у 41,5%, IV — у 16,3% больных. В 46,4% случаев полипозный процесс сопровождался наличием экссудата (серозного или гнойного) в верхнечелюстных пазухах, который верифицировался либо в предоперационном периоде (при диагностической пункции верхнечелюстной пазухи), либо при проведении оперативного вмешательства. Нам не удалось выявить чёткой корреляционной связи между распространённостью полипозного процесса и наличием гнойного воспаления. Наибольший процент гнойно-полипозного поражения отмечался при III—IV стадиях, что обусловлено не только чисто механическим фактором obturации выводных соустьев пазух полипами или рубцовым процессом, но и выраженными изменениями местного мукозального иммунитета. Однако у больных с I и II стадиями распространённости полипозного процесса выявлен выраженный гнойно-воспалительный процесс, по поводу которого пациенты изначально обращались за медицинской помощью, воспалительный процесс явился следствием раннее перенесённого вирусного заболевания (ОРВИ, грипп).

Из числа обследованных у 25,9% пациентов выявлены хронические неспецифические заболевания лёгких (обструктивный бронхит, бронхиальная астма), доминировала инфекционно-

аллергическая форма заболевания. Длительность заболевания бронхиальной астмой колебалась от 3 до 20 лет с частыми обострениями, особенно в осенне-зимний период и после перенесённого ОРВИ. Именно в этой группе больных отмечался высокий процент рецидивирования полипозного синусита. Показатели изменений параметров интерферонового ответа у пациентов двух наблюдаемых групп представлены в табл. 1.

Дисфункция системы ИФН у больных 1-й группы проявилась снижением у 79% больных гамма-ИФН продуцирующей способности лейкоцитов до II степени, тогда как у пациентов 2-й группы снижение отмечено лишь у 53,8% больных по продукции ИФН-гамма, а у 15% больных снижение до IV степени, в отличие от пациентов 1-й группы. По продукции альфа-ИФН в двух группах больных значимых различий не выявлено. III-IV степень выраженности изменений в продукции гамма-ИФН была характерна для пациентов 2-й группы.

У больных с первично выявленным полипозным синуситом (1-я группа) изменения в иммунном статусе носили разнонаправленный характер и определялись степенью выраженности воспалительного процесса. В 10 случаях отмечался нейтрофильный лейкоцитоз, у 7 больных имела место активация Т-клеточного иммунного ответа (повышение абсолютного количества CD3+ клеток до 2500 кл/мл, при уровне нормы до 800 кл/мл; CD8+лимфоцитов до 1100 кл/мл при норме до 800 кл/мл). У 10 больных отмечено повышение абсолютного количества NK (CD16+) до 780 кл/мл (при норме до 450 кл/мл). Со стороны гуморального иммунитета у 10 больных снижение количества IgG до 7 мг/мл при норме 18 мг/мл и в 16 случаях повышение содержания IgE до 250 Ед/мл при норме 110 Ед/мл. У больных 2-й группы — с рецидивирующим полипозным синуситом в 10 случаях наблюдалось повышение абсолютных показателей CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+ лимфоцитов, а в 25 случаях — повышение в 3,8 раза NK-клеток; снижение в 3 раза уровня IgG на фоне увеличения в 3,2 раза количества IgE. С учётом особой роли в триггерном ме-

ханизме персистенции вирусов, с изменением уровня цитокинов в виде дисфункции продукции альфа-ИФН и гамма-ИФН, целесообразно применение циклоферона, для коррекции иммунных нарушений и системы ИФН.

Впервые тесная связь между хроническим полипозным синуситом и заинтересованностью системы интерферона выявлена в исследовании А. Е. Константинова, при использовании в лечении назального полипоза с противорецидивной целью комбинации интерферонов (виферон) и индукторов интерферона (циклоферон, амиксин). Положительный эффект достигнут системным введением препаратов [19].

Система интерферона выявляет заинтересованность при развитии полипозного синусита и характеризуется появлением ранних изменений, определяется тесная корреляционная связь между степенью распространённости, продолжительностью и «агрессивностью» полипозного процесса и изменениями в системе интерферона. Чем длительнее и распространённее полипозный процесс, тем глубже дефицит гамма-интерферона, достигающего III–IV степени, особенно при сочетании полипозного синусита с бронхиальной астмой. Дефицит альфа-интерферона достигает высоких степеней при ассоциации полипозного синусита с выраженным воспалительным процессом. Выраженное снижение титров альфа-интерферона до III–IV степени характерно для больных с первично выявленным полипозным синуситом.

Больным с рецидивирующим полипозным синуситом (70 пациентов) проведён курс противорецидивной терапии циклофероном. Принимая во внимание более глубокие сдвиги в показателях интерферонового ответа (см. табл. 1) у больных с рецидивирующим полипозным синуситом, применялся прерывистый курс введения циклоферона длительностью до 6 месяцев. При изучении спектра циклоферон-индуцированных цитокинов на основе выявления иРНК для цитокинов в человеческих перевиваемых клеточных линиях иммунного и неиммунного происхождения показано ингибирование продукции мРНК циклофероном для ИЛ-4, ИЛ-10, основных противовоспалительных цитокинов, являющихся антагонистами гамма-ИФН, запускающих Th2-иммунный ответ. Препарат индуцирует ФГА-стимулированный иммунный ответ для ТНФ-альфа, ИЛ-1, ИЛ-8, альфа-ИФН (провоспалительные цитокины), являясь индуктором смешанного Th1/Th2 иммунного ответа [13–14].

После операции использованы интрамукозные инстилляций в полости пазух 5% линимента циклоферона и его аппликации в послеоперационные полости. В течение 2 недель применялось трёхразовое введение препарата в неделю, затем

14 дней перерыв, далее 2-недельные курсы чередовались с 2-недельными перерывами. За период наблюдения пациенты отмечали субъективно выраженное уменьшение количества выделений из носа, улучшение отхождения отделяемого, свободное носовое дыхание. Пациенты с бронхиальной астмой отмечали улучшение дыхательной функции, показателей лёгочной вентиляции, в более лёгкой форме протекали традиционные весенне-осенние обострения, что позволило снизить дозы гормональных препаратов, а в ряде случаев отказаться от них. Максимальный эффект от комбинированного лечения полипозного синусита с использованием микроэндориносинусирургии и циклоферона в послеоперационном периоде отмечен у больных с первично выявленным полипозным синуситом I и II степени распространённости процесса, за счёт его умеренно выраженной обратимости патологического процесса. У больных рецидивирующим полипозным синуситом с дефицитом ИФН-продукции III и IV степени хороший результат от проведённой комплексной терапии проявился отсутствием клинических признаков рецидивирования полипозного процесса на фоне повышения продукции уровня интерферонов (табл. 2).

Группа больных с рецидивирующим полипозным синуситом требовала более тщательного динамического наблюдения в отсроченном периоде через 12 мес, в связи с необходимостью проведения повторных курсов индуктивной интерферонотерапии циклофероном. Повторные курсы проведены 45 больным с рецидивирующим полипозным синуситом через 12 месяцев и 28 больным с первично выявленным полипозным синуситом.

Для проведения сравнительного анализа эффективности комплексного лечения полипозного синусита с использованием эндоскопической риносинусирургии и противорецидивного лечения индуктором интерферона циклофероном в качестве сравнения проанализирована эффективность у больных, получавших кортикостероидные топические препараты (назонекс, альцедин). Группа сравнения представлена 25 пациентами с первично выявленным полипозным синуситом, с рецидивирующим синуситом и с синдромом Самтера. У 12 (48%) человек отмечен положительный эффект применения назальных кортикостероидов, проявляющийся уменьшением отёчности слизистой оболочки полости носа, улучшением носового дыхания, однако на фоне положительной местной динамики показатели интерферонового ответа оставались без изменений, указывая на отсутствие активного воздействия на одно из этиопатогенетических звеньев формирования полипозного процесса. У 8 (32%) больных ожидаемого эффекта от применения местных кортикостероидных препаратов

Таблица 2. Показатели интерферонового статуса больных через 12 месяцев

Субтипы ИФН	Уровень нормы, %	Степень выраженности дефицита, %			
		I	II	III	IV
Первичный полипозный синусит, n=28					
ИФН-альфа	Исходный уровень	32,5	46,5	16,3	4,6
	Уровень нормы — 0				
	Через 12 мес	11,0	—	—	—
ИФН-гамма	Уровень нормы — 89,0				
	Исходный уровень	—	79,0	21,0	—
	Уровень нормы — 0				
	Через 12 мес	22,0	—	—	—
	Уровень нормы — 78,0				
Рецидивирующий полипозный синусит, n=45					
ИФН-альфа	Исходный уровень	20,5	57,5	22,5	—
	Уровень нормы — 0				
	Через 12 мес	17,5	17,5	—	—
ИФН-гамма	Уровень нормы — 82,5				
	Исходный уровень	—	31,2	53,8	15,0
	Уровень нормы — 0				
	Через 12 мес	67,5	6,6		
	Уровень нормы — 26,0				

не отмечалось, даже при замене одного препарата другим: сохранялась гиперсекреция, заложенность носа, отмечена распространённость полипозного синусита до уровня II степени. У 5 (20%) человек отмечена отрицательная динамика, выражающаяся ухудшением носового дыхания за счёт обилия слизистых выделений при активном рецидивировании полипозного синусита. Трое из этих больных были переведены на терапию циклофероном, где был получен более стойкий и выраженный клинический эффект.

Заключение

Занимая лидирующее положение в структуре заболеваний верхних дыхательных путей, хронические синуситы выявляются у 5—10% населения. Наиболее неблагоприятной формой воспалительных заболеваний околоносовых пазух является хронический гиперпластический (полипозный) синусит, распространённость которого составляет 1,1% от всего населения, частота рецидивирования полипозного синусита колеблется в пределах от 5 до 60%. Наиболее распространённой тактикой лечения является хирургическое вмешательство с последующим курсом противорецидивной терапии; широкое распространение получили топические кортикостероиды V поколения, но их существенным недостатком является иммунодепрессивное действие на слизистую оболочку

носа, подавление активности лимфоидного аппарата дыхательных путей, угнетение симпатoadrenalной системы при длительном применении. Учитывая, что в возникновении и течении полипозного синусита большую роль играет состояние мукозального иммунитета, роль вирусной инвазии в качестве триггерного механизма полипоза и персистенции вирусов в слизистой оболочке носа и околоносовых пазухах, очевидным является несовершенство местной кортикостероидной терапии, а целесообразность применения циклоферона в противорецидивном лечении обоснована.

У больных хроническим полипозным синуситом выявлена различная (II—III) степень дефицита продукции интерферона. Этиопатогенетический подход в лечении полипозного синусита включает максимально щадящее и минимально инвазивное оперативное вмешательство в объёме эндориносинусохирургии с последующей противорецидивной терапией циклофероном. Резюмируя результаты лечения пациентов, получавших местную терапию кортикостероидами, следует отметить клиническую эффективность в 47% случаев против 53% больных, получавших циклоферон. В 33% случаев наблюдали гиперсекрецию, ухудшение носового дыхания, активное рецидивирование заболевания у пациентов группы сравнения против 13,1% больных получавших лечение циклофероном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муминов А. И., Плужников М. С., Рязанцев С. В. Полипозные риносинуситы. Ташкент, Медицина, 1990; 152.
2. Портенко Г. М. Совершенствование диагностики, клиники, профилактики и лечения полипозного риносинусита. Автореф. дисс. д.м.н. Калинин. 1989; 33.
3. Тарасов Д. И. К этиологии, патогенезу, клинике и лечению при полипозных синуситах. Автореф. дисс. д.м.н. М.: 1965; 45.
4. Добрынин К. Б. Транскраниальная электростимуляция в противорецидивном лечении полипозного риносинусита. Автореф. дисс. д.м.н. 1999; 39.
5. Лопатин А. С. Внутриносовые корригирующие операции в комплексном лечении различных форм хронического полисинусита. Автореф. дисс. к.м.н. М.: 1989; 22.
6. Лопатин А. С. Принципы общей и местной стероидной терапии в лечении полипозных риносинуситов. Рос ринол 1996; 32: 31—33.

7. *Арефьева Н. А.* Иммунологические аспекты рецидивирующих ринитов. Рос ринология. 1996; 2: 10—12.
8. *Азнабаева Л. Ф., Арефьева Н. А., Салахлова А. Х.* Продукция цитокинов клетками иммунной системы у больных различными формами хронического риносинусита. Вестн отоларингол 2001; 2: 8—10.
9. *Ельков И. В., Астахова Г. М., Кузнецова О. Н.* Лечение персистирующей вирусной инфекции при хроническом гайморите. Рос ринолог 1994; 2: 54.
10. *Быкова В. П.* Структурные основы мукозального иммунитета верхних дыхательных путей. Рос ринолог 1999; 1: 5—9.
11. *Cajal N., Surdan C.* Determinanari oto-rino-lariengienr in infectiile virotice. Oto-rino-larieng 1971; 2: 81—94.
12. *Papulekar S. S., Rapoport A., Paoness D.* Epstein-Barr virus the ravager. Ann Otol 1978; 87: 5: 729—735.
13. *Ершов Ф. И., Романцов М. Г., Коваленко А. Л.* Циклоферон: итоги и перспективы клинического применения. СПб.: 1999; 80.
14. *Романцов М. Г., Ершов Ф. И., Коваленко А. Л.* Индукторы интерферона: перспективы применения в клинике. Врач 1999; 3: 36—39.
15. *Лискунов С. В.* Методика исследования транспортной функции мерцательного эпителия. Евпатория. 1995; 59—61.
16. *Воячек В. И.* Болезни носовой перегородки. Болезни носа и придаточных полостей. Киев. 1941; 240—261.
17. *Duvoisin B., Landry M.* Low-dose CT and inflammatory disease of the paranasal sinuses. Neuroradiology 1991; 33: 403—406.
18. *Григорян С. С., Майоров И. А., Иванова А. М.* Оценка интерферонового статуса людей по пробам цельной крови. Вопросы вирусол 1998; 4: 433—436.
19. *Константинов А. Е.* Использование интерферонов и их индукторов в комплексном лечении полипозных риносинуситов. Автореф. дисс к.м.н. М.: 2000; 21.

Мукормикоз у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге

С. Н. ХОСТЕЛИДИ¹, А. Г. ВОЛКОВА², М. О. ПОПОВА², Т. С. БОГОМОЛОВА¹, А. С. КОЛБИН³,
Э. Г. БОЙЧЕНКО³, Э. И. ПОДОЛЬЦЕВА⁴, А. В. КЛИМОВИЧ⁴, М. Б. БЕЛОГУРОВА⁴, Н. В. МЕДВЕДЕВА⁴,
И. С. ЗЮЗГИН⁵, Л. С. ЗУБАРОВСКАЯ², Н. В. ВАСИЛЬЕВА¹, Н. Н. КЛИМКО¹

¹ ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург

³ Городская больница № 31, Санкт-Петербург

⁴ Детская городская больница № 1, Санкт-Петербург

⁵ Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург

Invasive Mucormycosis In Patients with Hemoblastosis in St.-Petersburg

S. N. KHOSTELIDI, A. G. VOLKOVA, M. O. POPOVA, T. S. BOGOMOLOVA, A. S. KOLBIN,
E. G. BOYCHENKO, E. I. PODOLTSEVA, A. V. KLIMOVICH, M. B. BELOGUROVA,
N. V. MEDVEDEVA, I. S. ZUZGIN, L. S. ZUBAROVSKAYA, N. V. VASILYEVA, N. N. KLIMKO

¹ I.I.Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg

² I.P.Pavlov St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg

³ Pediatric Hospital No.1, St. Petersburg

⁴ Municipal Hospital No. 31, St. Petersburg

⁵ Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg

Обследовано 36 больных мукормикозом в 10 стационарах Санкт-Петербурга с 2004 по 2013 гг. Наиболее частыми фоновыми заболеваниями мукормикоза были острые лейкозы (64%). Почти в 100% случаев у таких больных инвазивный мукормикоз развивается как внутрибольничная инфекция. Проанализированы факторы риска, этиологию, основные клинические признаки, особенности тактики лечения мукормикоза у гематологических больных в Санкт-Петербурге.

Ключевые слова: гемабластозы, мукормикоз, антифунгальная терапия.

Thirty four patients with mucormycosis in 10 hospitals of St. Petersburg were observed in 2004—2013. The most frequent underlying diseases of mucormycosis were acute leukoses (64%). In 100% of the patients mucormycosis developed as a nosocomial infection. The risk factors, etiology, basic clinical signs and strategy in the treatment of mucormycosis were analyzed.

Key words: hemoblastosis, mucormycosis, antifungal therapy.

Введение

Мукормикоз (зигомикоз) — тяжёлая оппортунистическая инфекция. В настоящее время во всем мире отмечен рост частоты заболеваемости мукормикозом, особенно у онкогематологических больных. Это связано не только с совершенствованием методов диагностики микозов, но и с более «агрессивными» схемами цитостатической терапии, широким использованием трансплантации кроветворных стволовых клеток как «терапии спасения» [1].

Следует отметить, что меняется и спектр фоновых заболеваний мукормикоза. В 1980—1990-х гг. мукормикоз развивался преимущественно у больных декомпенсированным сахарным диабетом [2,

3]. В последние годы мукормикоз наиболее часто развивается у онкогематологических больных.

В статье представлены результаты сравнительного анализа клинических случаев, наблюдаемых нами гематологических больных мукормикозом в клиниках Санкт-Петербурга (2002—2013 гг.).

Материал и методы

Настоящее исследование являлось проспективным, динамическим и обсервационным. В ходе совместной научно-исследовательской работы создан регистр больных мукормикозом. Под наблюдением находились 57 больных мукормикозом в 10 стационарах Санкт-Петербурга в течение 9 лет (2002—2013 гг.). Учитывали более 150 показателей, включавших данные об анамнезе заболевания и жизни пациентов, наличие факторов риска развития инвазивных микозов, а также результаты обследования и лечения.

Лабораторная диагностика включала микроскопическое и культуральное исследование. Из образцов биосубстратов (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж — БАЛ, отделяемое из околоносовых придаточных пазух и др.) готовили препараты в просветляющей жидкости (10% раствор КОН в 10% водном растворе глицерина) и с просветляющей

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 4. СЗГМУ им. И. И. Мечникова

Таблица 1. Основные фоновые заболевания онкогематологических больных мукомикозом в Санкт-Петербурге

Нозологическая форма (МКБ-10)	Число больных, <i>n</i> =36	
	абс.	%
Острый миелобластный лейкоз	13	36
Острый лимфобластный лейкоз	10	28
Нейробластома	2	6
Лимфогранулематоз	2	6
Неходжкинская лимфома	1	3
Апластическая анемия	1	3
Анемия Фанкони	1	3
Миелодиспластический синдром	1	3
Миелоидная саркома	1	3
Хронический лимфолейкоз	1	3
Хронический миелолейкоз	1	3
Миеломная болезнь	1	3

маркёра (калькофлуор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминисцентном микроскопе, отмечали наличие нитей несептированного мицелия, ветвящихся под углом 90°.

Биопсийный, операционный или секционный материал после фиксации формалином подвергали обезжизнению и заливали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм. В дальнейшем срезы окрашивали гематоксилином-эозином, проводили PAS-реакцию и окраску по методу Гомори—Грокотта для выявления элементов гриба в тканях.

Для диагностики мукомикоза проводили компьютерную томографию лёгких и придаточных пазух носа (ППН) в режиме высокого разрешения, магнитную резонансную томографию, фибробронхоскопию, плевральные и люмбальные пункции, пункции придаточных пазух носа, а также биопсию тканей и патоморфологические исследования.

Диагностировали мукомикоз и оценивали эффективность антифунгальной терапии на основании критериев, предложенных Европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC) и группой, исследующей микозы (MSG), Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) США [4, 5]. Внутрибольничный мукомикоз диагностировали, исходя из критериев Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ, 1979 г.), а также дополнений, предложенных в 1993 г. Внутрибольничным мукомикоз считали, если инфекция развилась через 48 часов и более после поступления в лечебное учреждение, а также в случае повторного поступления пациента в стационар с инфекцией, явившейся следствием предыдущей госпитализации [ВОЗ, 1993].

Результаты исследований

В период с 2002 по 2013 гг. мы наблюдали 57 больных мукомикозом в 10 стационарах Санкт-Петербурга. Среди них — 36 больных с онкологической и гематологической патологией в 9 стационарах, в возрасте от 5 до 74 лет (медиана возраста 23 ± 12 лет). Среди них детей было 14 (38%, медиана возраста 11 ± 3 лет), взрослых — 22 (62%, медиана возраста 28 ± 14 лет), мужчин — 18 (53%), женщин — 16 (45%).

Почти у всех пациентов с онкогематологической патологией (97%) мукомикоз развился после длительного нахождения в условиях стационара. Следует отметить, что мукомикоз развивался в среднем на 36-й день госпитализации (медиана 36 ± 7). У одного больного мукомикоз

развился в период амбулаторного наблюдения после перенесённой аллогенной трансплантации кроветворных стволовых гемопоэтических клеток (ТКСК).

Анализ фоновых заболеваний у больных с гематологической и онкологической патологией продемонстрировал, что наиболее часто мукомикоз развивался у пациентов с острыми лейкозами — острым миелобластным и острым лимфобластным лейкозом (64%). Реже фоновыми заболеваниями были нейробластома, лимфогранулематоз, неходжкинская лимфома, апластическая анемия, анемия Фанкони, миелодиспластический синдром, миелоидная саркома и миеломная болезнь. Основные фоновые заболевания представлены в табл. 1.

Изучение факторов риска показало, что мукомикоз развивался сразу после или во время проведения цитостатической полихимиотерапии (ПХТ), причём преимущественно после 4—5-го курса ПХТ. Длительный агранулоцитоз был выявлен у 92% больных, средняя продолжительность агранулоцитоза — 30 дней (медиана). Лимфоцитопению определяли реже — у 86% больных, средняя продолжительность — 25 дней (медиана) (табл. 2).

Две трети больных получали глюкокортикостероиды (ГКС), причём 77% из них получали ГКС длительно в составе иммуносупрессивной терапии, применяемой по поводу острой и/или хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Средняя продолжительность применения ГКС была 48 дней. После аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток (ТКСК) мукомикоз развивался у 18 больных. Причём преимущественно в позднем посттрансплантационном периоде (медиана дней после трансплантации, до диагностирования мукомикоза — 110).

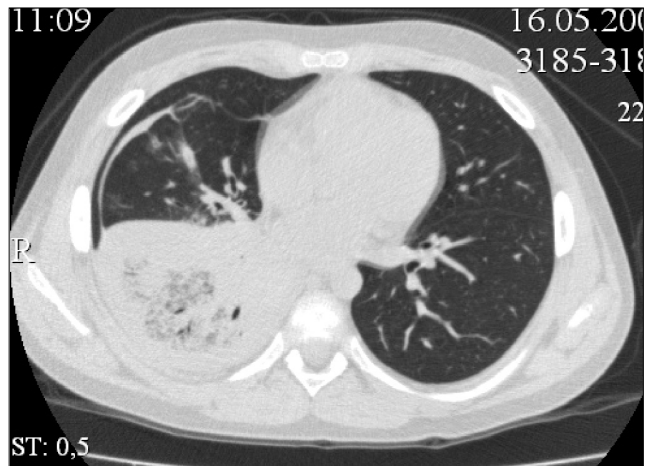
Проанализировав, как часто мукомикоз развивается в сочетании с другими микозами, мы обнаружили, что у 50% больных мукомикоз диа-

Таблица 2. Факторы риска и фоновые состояния у больных мукормикозом, на фоне онкогематологической патологии

Факторы риска и фоновые состояния	Число больных, <i>n</i> =36	
	абс.	%
Полихимиотерапия	36	100
число курсов ПХТ	медиана — 4	
Агранулоцитоз	33	92
длительность агранулоцитоза	медиана — 30	
Лимфоцитопения	31	86
длительность лимфоцитопении	медиана — 25	
Глюкокортикостероиды	24	67
длительность приёма ГКС	медиана — 48	
Алло-ТКСК	18	50

Таблица 3. Клинические варианты мукормикоза у онкогематологических больных

Клинические варианты мукормикоза	Число больных, <i>n</i> =36	
	абс.	%
Поражение лёгких	23	64
Поражение придаточных пазух носа	8	22
Поражение кишечника	3	8
Поражение кожи и мягких тканей	1	3
Поражение костной ткани	1	3

**Рис. 1. Некроз тканей («черный струп») при поражении придаточных пазух носа у больной с хроническим лимфобластным лейкозом и мукормикозом.****Рис. 2. КТ органов грудной полости больного мукормикозом на фоне апластической анемии.**

гностировали через 1—65 дней после диагностики инвазивного аспергиллёза.

Исследование показало, что первичный очаг поражения наиболее часто локализовался в легких (64%) и придаточных пазухах носа (22%). В единичных случаях в костной ткани, кишечнике, коже и мягких тканях (табл. 3). Дальнейшее распространение процесса и вовлечение других органов и систем развивалось у 50% больных.

Клинические исследования включали сбор субъективных (жалобы) и объективных (осмотр) данных. Наиболее часто пациенты отмечали повышение температуры тела (выше 38,5°C), кашель, кровотечение и локальный болевой синдром. Лихорадку выше 38,5°C отмечали у всех больных (100%). При первичном поражении лёг-

ких сухой кашель, периодами со скудной мокротой наблюдали у 96% (*n*=22), у 50% из них кашель сопровождался кровохарканьем и локальным болевым синдромом. При первичном поражении придаточных пазух носа всех больных беспокоили локальные боли, признаки кровотечения наблюдали у 63% (*n*=5) больных. Некроз тканей и характерный черный струп (рис. 1) также наблюдали у двух третей больных с поражением придаточных пазух носа. У пациентов с первичным поражением кишечника основными клиническими признаками были симптомы «острого живота», интенсивность которых постепенно нарастала.

Для выявления поражения различных органов и систем больным проводили инструментальные исследования — компьютерную томографию лёг-



Рис. 3. Микроскопия биоптата слизистой ППН больной хроническим лимфобластным лейкозом и мукормикозом (окраска калькофлуором белым, $\times 200$).

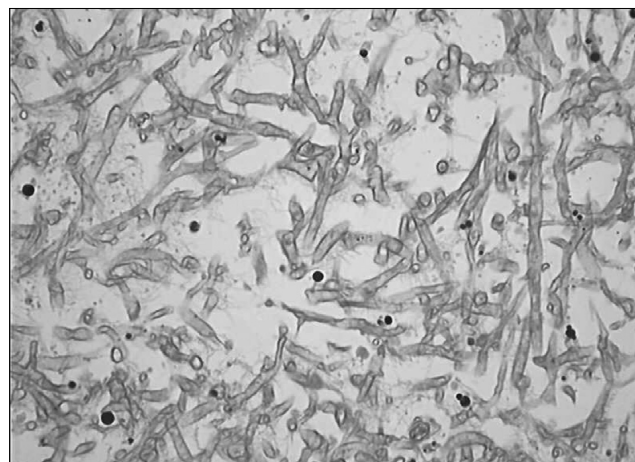


Рис. 4. Гистологический препарат ткани легкого (аутопсия) больной острым миелоидным лейкозом и мукормикозом (PAS-реакция, $\times 400$).

Таблица 4. Антифунгальная терапия мукормикоза у онкогематологических больных

Антифунгальная терапия	Число больных, $n=27$	
	абс.	%
Позаконазол	16	59
Амфотерицин В	15	55
Липидный комплекс АмВ	13	48
Каспофунгин	9	33
Вориконазол	2	7
Липосомальный АмВ	1	4
Микафунгин	1	4
Два и более антимикотиков	20	74
Комбинированная терапия	14	52

ких (КТ) и околоносовых придаточных пазух, магнитно-резонансную томографию (МРТ), ультразвуковое исследование.

КТ лёгких проводили всем больным (рис. 2). У всех больных на начальных стадиях заболевания выявляли очагово-инфильтративные изменения в лёгких. В 89% случаев поражение было односторонним, с последующим распространением у 50% больных. Также у половины больных отмечали наличие гидроторакса.

КТ придаточных пазух носа было выполнено у 40% больных. Признаки синусита определялись у 28% всех больных.

МРТ головного мозга было проведено у 44% больных. У трёх пациентов выявили очаговые поражения.

С целью идентификации возбудителя заболевания проводили забор патологического материала из очагов поражения для микологического исследования. Исследовали следующие биосубстраты — мокроту, промывную жидкость из бронхов, плевральную жидкость, спинномозговую жидкость, промывные воды придаточных пазух носа (ППН), кровь, биоптаты.

Наличие несептированного мицелия, ветвящегося под прямым углом при прямой микроско-

пии (рис. 3) и/или гистологическом исследовании, отмечали у 100% больных (рис. 4). Выявляли наличие в биосубстратах нитей широкого несептированного мицелия, ветвящиеся, преимущественно под углом 90° .

У 64% больных получен рост культуры микромицетов, с последующей идентификацией до вида. Возбудителями мукормикоза были: *Lichtheimia corymbifera* (17%, $n=4$), *Rhizomucor pusillus* (17%, $n=4$), *Rhizopus microsporus* (9%, $n=2$), *Rhizopus oryzae* (9%, $n=2$), *Rhizopus* spp. (30%, $n=7$), *Rhizomucor* spp. (13%, $n=3$), *Mucor* sp. (3%, $n=1$). Более чем у трети больных возбудителя в культуре выделить не удалось. Гистологическое исследование проводили у 56% больных, у всех из них диагноз был подтверждён.

Следует отметить, что эмпирическую антимикотическую терапию получали только 33% больных (амфотерицин В, вориконазол, эхинокандины). Другая треть пациентов получала этиотропную антимикотическую терапию по поводу инвазивного аспергиллёза (вориконазол, эхинокандины).

Антимикотическую терапию мукормикоза получали 75% больных (у 25% больных диагноз был установлен посмертно). Для лечения мукормикоза применяли позаконазол (59%), амфотерицин В

(55%), липидный комплекс амфотерицина В (48%), каспофунгин (33%), вориконазол (7%), липосомальный амфотерицин В (4%) и микафунгин (4%) (табл. 4). У 44% больных, получавших амфотерицин, в последующем развились признаки почечной недостаточности, что потребовало коррекции дозы амфотерицина В или его отмены.

Продолжительность лечения составляла от 1 до 231 дня (медиана — 57).

Следует отметить, что эхинокандины и вориконазол использовали в сочетании с липидным амфотерицином В, амфотерицином В или позаконазолом. Комбинированную терапию получали 52% больных. Также у 52% больных применение антимикотиков сочетали с хирургическим лечением. Проводили: синусотомию, лобэктомию, резекцию ребер, резекцию кишечника, некрэктомию кожи и мягких тканей.

Основным критерием оценки эффективности антимикотической терапии считали выживаемость больных мукормикозом. Общая выживаемость в течение 3 месяцев больных мукормикозом, получавших антимикотическую терапию, составила 50%, общая выживаемость в течение 6 месяцев — 44%. Общая выживаемость в течение 12 месяцев — 37% (рис. 5). Средняя продолжительность жизни больных мукормикозом составляет 7 месяцев.

Обсуждение

Мукормикоз — тяжёлая инфекция, характеризующаяся высокой летальностью. В последнее время неоднократно проводились попытки систематизации имеющихся данных об этом заболевании [1—3]. В одном из ретроспективных исследований, проведённом в США, были рассмотрены 929 случаев мукормикоза в США, в период с 1940 по 2000 гг. При исследовании выявлено, что частота мукормикоза составляет 1,7 случаев на 1 000 000 человек в год, т. е. приблизительно 500 случаев в год [3]. Новые исследования продемонстрировали, что число случаев мукормикоза прогрессивно растёт. Так, в международном регистре Европы только за 3 года было зарегистрировано 237 случаев этого заболевания [6].

Меняется и спектр фоновых заболеваний. Если ранее считали, что основным фоновым заболеванием для мукормикоза является декомпенсированный сахарный диабет [3], то на сегодняшний день данное «преимущество» отведено онкогематологическим заболеваниям. В ряде европейских исследований продемонстрировано, что мукормикоз развивается преимущественно у гематологических больных — в 58% [4] и 60% случаев [6, 7]. Мы также наблюдали, что онкогематологические заболевания являются основными фоновыми нозологиями — у 64% наблюдаемых больных.

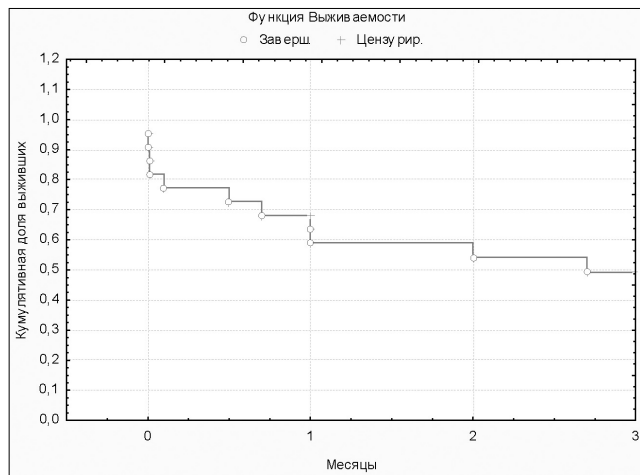


Рис. 5. Выживаемость онкогематологических больных с мукормикозом в течение 3 месяцев.

В соответствии с критериями EORTC/MSG (2008), к основным факторам риска инвазивных микозов относят: длительную нейтропению (количество нейтрофилов в периферической крови менее 500 в 1 мкл, продолжительностью 10 дней и более), длительный приём глюкокортикостероидов (в пересчёте на преднизолон более 0,3 мг/кг/сут), продолжительность применения 21 день и более; приём иммуносупрессантов (циклоsporин, такролимус), недавний или текущий; реакция «трансплантат против хозяина» у пациентов после аллогенной трансплантации кроветворных стволовых кроветворных клеток; СПИД; первичные иммунодефициты (хроническая гранулематозная болезнь, тяжёлый комбинированный иммунодефицит [6]. Наше исследование подтвердило, что мукормикоз чаще развивался у больных во время или непосредственно после полихимиотерапии, на фоне длительного агранулоцитоза (более 30 дней) и лимфоцитопении (более 25 дней).

Анализ результатов проведённого нами исследования, а также данные литературы позволяют говорить о том, что наиболее частой клинической формой мукормикоза у онкогематологических больных является поражение лёгких (50—61%) [4, 7, 8].

Диагностика мукормикоза требует многократного лабораторного исследования материала из очагов поражения, что часто трудно выполнимо, ввиду тяжести состояния пациентов. Мы диагностировали мукормикоз посмертно у 25% больных. Следует отметить, что в начале прошлого десятилетия L. Pagano и соавт. в 2004 г. сообщали, что более 54% случаев мукормикоза диагностированы на аутопсии [9—12]. По данным общеевропейского исследования [6], идентифицирован патоген после смерти был у 4% больных.

Диагностику мукормикоза проводили согласно критериям EORTC/MSG 2008 г. [6]. Микроскопические признаки наличия мукормикоза

в биосубстратах обнаружили у всех больных. Культуральное исследование было позитивным у 64% онкогематологических больных инвазивным микозом. В то же время по данным Skiada A. и соавт. 2011 г. в Европе мукормицеты высевали у 75% всех больных [6].

В результате микологического обследования нами выявлен широкий спектр возбудителей мукормикоза у онкогематологических больных. Возбудителями были *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* sp.. Интересно, что в общеевропейском исследовании также преимущественно выделяли грибы рода *Rhizopus*, однако вторыми по частоте возбудителями были *Mucor* sp. [4], которые были выявлены в Санкт-Петербурге только у одного больного.

Наблюдения A. Skiada и соавт. [6] продемонстрировали, что у 40% больных использовали хирургическое лечение. В Санкт-Петербурге оперативным вмешательствам были подвергнуты 52% больных.

Согласно общеевропейскому исследованию, основным антимикотиком, используемым для лечения, был амфотерицин В и его производные (39%), причём две трети из них использовали липидный комплекс амфотерицина В. В Санкт-Петербурге наиболее часто использовали позаканазол, реже амфотерицин В и его липидные комплексы. При этом более половины больных получали комбинированную терапию. В основном для комбинированной терапии использовали вориконазол, каспофунгин и микофунгин.

В 2012 году мы впервые использовали микафунгин в комбинации с позаканазолом для лечения мукормикоза. Микафунгин является препаратом, получаемым при химической переработке продуктов жизнедеятельности гриба *Coleophoma empedri*. Он обладает широким спектром активности *in vitro*, который включает *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, в том числе штаммы, резистентные к азолам и амфотерицину В. Как и все эхинокандины, микафунгин не активен против мукормицетов [1]. В то же время в экспериментальных моделях на животных была установлена активность препарата при комбинированном лечении мукормикоза [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н. Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей 2-е издание. М.: 2008; 335.
2. Хостеллиди С. Н. Главное о зигомикозе (обзор). Проблем мед микол 2006; 8: 4: 8—18.
3. Roden M. M., Zaoutis T. E., Buchanan W. L. et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. Clin Infect Dis 2005; 41: 634—653.
4. De Pauw B., Walsh T. J., Donnelly J. P. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46: 12: 1813—1821.

Позже появились публикации об успешном использовании комбинации микафунгина с другими препаратами при лечении мукормикоза [14, 15]. Наш опыт, первый в России, также показал эффективность данной методики. Через 3 месяца после диагностирования мукормикоза лёгких у больного анемией Фанкони, после перенесённой алло-ТКСК, была зафиксирована ремиссия инфекционного процесса. В настоящее время он продолжает получать вторичную антимикотическую профилактику.

Несмотря на применение новых антимикотических препаратов, выживаемость больных мукормикозом с онкогематологической патологией остается низкой. Так, по данным A. Skiada с соавт. [5], выживаемость больных мукормикозом после перенесённой трансплантации кроветворных стволовых клеток составила 24% [4]. По данным L. Pagano и соавт. в 2004 г. выживаемость у онкогематологических больных мукормикозом была — 13% [9]. По данным нашего регистра в 2011 году выживаемость онкогематологических больных в течение 3 месяцев составляла 27%, в 2012 г. — 37%, в 2013 г. — 50%.

Выводы

1. Основными фоновыми заболеваниями у онкогематологических больных с мукормикозом являются острый миелобластный и острый лимфобластный лейкоз (64%);
2. У онкогематологических больных основным клиническим вариантом мукормикоза является поражение лёгких (64%);
3. Основными возбудителями мукормикоза у онкогематологических больных являются грибы рода *Rhizopus* (48%);
4. Выживаемость онкогематологических больных с мукормикозом в течение 12 недель составила 50%.

С совершенствованием клинико-лабораторных методов стало возможным поставить диагноз на более ранних стадиях заболевания, а благодаря разработкам новых хирургических методов лечения и успехам антимикотической терапии в настоящее время, удастся избежать 100% летальности, которая сопутствовала мукормикозу в недалеком прошлом.

5. Segal B. H., Herbrecht R., Stevens D. A. et al. Defining Responses to Therapy and Study Outcomes in Clinical Trials of Invasive Fungal Diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer Consensus Criteria. CID 2008; 47: 674—683.
6. Skiada A., Pagano L., Groll A. et al. European Confederation of Medical Mycology Working Group on Zygomycosis. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 12: 1859—1867.
7. Pagano L., Valentini C. G., Posteraro B. et al. Zygomycosis in Italy: a survey of FIMUA-ECMM (Federazione Italiana di Micopatologia Umana ed Animale and European Confederation of Medical Mycology). Chemotherapy 2009; 3: 322—329.

8. Petrikos G., Skiada A., Lortholary O., Roilides E., Walsh T. J., Kontoyannis D. P. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 1: 23–34.
9. Pagano L., Fianchi L., Leone G. Fungal pneumonia due to molds in patients with hematological malignancies. *Chemotherapy* 2006; 18: 4: 339–352.
10. Pagano L., Offidani M., Fianchi L. et al. Mucormycosis in hematologic patients. *Haematologica* 2004; 89: 2: 207–214.
11. Lanternier F., Dannaoui E., Morizot G., Elie C., Garcia-Hermoso D., Huerre M., Bitar D., Dromer F., Lortholary O., French Mycosis Study Group. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis* 2012; 54: 1: 35–43.
12. Gleissner B., Schilling A., Anagnostopoulou I., Siehl I., Thiel E. Improved outcome of zygomycosis in patients with hematological diseases? *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 7 1351–1360.
13. Javier Pastor F., Guarro J. Micafungin: experimental therapy of fungal infections in animal models. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26: 1: 42–48.
14. Ogawa T., Takezawa K., Tojima I., Shibayama M., Kouzaki H., Ishida M., Okabe H., Shimizu T. Successful treatment of rhino-orbital mucormycosis by a new combination therapy with liposomal amphotericin B and micafungin. *Auris Nasus Larynx* 2012; 39: 2: 224–228.
15. Van Sickels N., Hoffman J., Stuke L., Kempe K. Survival of a patient with trauma-induced mucormycosis using an aggressive surgical and medical approach. *J Trauma* 2011; 70: 2: 507–509.
16. Khostelidi S. N., Klimko N. N., Bogomolova T. S. et al. Mucormycosis in Saint Petersburg, Russia. *Mycoses: Diagn, Ther Prophyl of Fungal Dis* 2011; 54: 2: 99.
17. Khostelidi S. N., Klimko N. N., Bogomolova T. S. et al. Mucormycosis in patients with haematological and oncological diseases in Saint-Petersburg, Russia. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Book of abstracts. London, United Kingdom. 2012; 162.

Роль внутрикостного введения антибиотиков при лечении местнораспространённого рака слизистой оболочки полости рта

В. М. ИВАНОВ¹, О. В. ИВАНОВА², М. В. ШЕЙКИН¹

¹ ГБУЗ АО Областной онкологический диспансер, Астрахань

² ГБУЗ АО Стоматологическая поликлиника № 4, Астрахань

Role of Intraosteal Administration of Antibiotics in Treatment of Local Oral Mucinous Carcinoma

V. M. IVANOV, O. V. IVANOVA, M. V. SHEIKIN

Regional Oncologic Dispensary, Astrakhan

Stomatologic Polyclinic No. 4, Astrakhan

Статья посвящена вопросам профилактики инфекционных осложнений при лечении местнораспространённого рака слизистой оболочки полости рта у 204 больных. Убедительно показано, что для улучшения непосредственных результатов комбинированного и комплексного лечения этих больных лучшие показатели отмечаются при мультидисциплинарном подходе к оказанию помощи этим больным с обязательным привлечением стоматолога. Проведение специальных стоматологических профилактических и лечебных мероприятий с использованием реамберина местно и внутривенно при химиолучевой терапии и адекватной антибиотикотерапии в периоперационном периоде приводит к снижению инфекционных осложнений, что в конечном итоге сказывается на качестве жизни этих больных. Установлено преимущество внутрикостного введения антибиотиков.

Ключевые слова: рак полости рта, остеомиелит, лучевая терапия, реамберин, цитостатики, антибиотики, внутрикостное введение.

The problems of prophylaxis of infectious complications in the treatment of oral local mucinous carcinoma are considered relevant to 204 respective cases. More favourable results of the combined and complex treatment of the patients were shown when a multidisciplinary approach was used with obligatory participation of stomatologists. Special stomatologic prophylactic and therapeutic procedures with using reamberin orally and intravenously in the chemo- and radiotherapy and adequate antibiotic therapy during the surgical operation resulted in less frequent infectious complications, that was in favour of the patients life quality. Intraosteal administration of antibiotics was shown preferable.

Key words: oral cavity cancer, osteomyelitis, radiotherapy, reamberin, cytostatics, antibiotics, intraosteal administration.

Введение

Среди всех злокачественных новообразований на долю опухолей слизистой оболочки полости рта приходится около 2% [1]. Более половины больных с этой локализацией поступают в специализированные учреждения с местнораспространёнными формами заболевания [1–7]. Сложность лечения этих больных обусловлена особенностью анатомического строения, запущенностью опухолевого процесса, возникающими функциональными и косметическими дефектами после операции [5]. Наиболее эффективно у данной группы пациентов комбинированное лечение, хирургический компонент которого заключается в широком иссечении опухоли [6, 7]. Лучевая терапия злокачественных новообразова-

ний полости рта, особенно в сочетании с лекарственной терапией, сопровождается развитием лучевых реакций со стороны нормальных тканей в зоне облучения и более выраженными реакциями слизистых оболочек. Цитостатический эффект от лучевого воздействия и химиотерапии у этого контингента больных может вести к мукозиту с вовлечением в этот процесс всех составных компонентов ротовой полости: самой слизистой, малых и больших слюнных желёз, костных структур с обязательными изменениями в зубах [8, 9]. Наличие же различной микрофлоры, способной в любой момент привести к серьёзным осложнениям патологии со стороны зубов, обостряющейся при проведении химиотерапии, заставляет постоянно проводить специальные осмотры ротовой полости с профилактическими лечебными мероприятиями, изучать и совершенствовать методы прогнозирования оральных осложнений [10].

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: Астрахань, 414041, ул. Бориса Алексеева, 57. АО ООД

Операция заключается в радикальном удалении поражённой слизистой оболочки и мягких тканей полости рта, а также в краевой, либо сегментарной резекции нижней челюсти. Для замещения дефекта тканей полости рта используются различные виды кожно-мышечных либо кожно-жировых лоскутов. Предоперационная лучевая терапия или полихимиотерапия, сам характер операции, во время которой происходит обсеменение раны микрофлорой полости рта, сообщение с раневой поверхностью костных опилов нижней челюсти увеличивают риск развития местных гнойных осложнений. Исходя из этих предпосылок, представляется важным оценить влияние предоперационной подготовки и схемы антибактериальной терапии на частоту и характер местных гнойных осложнений.

Цель исследования — оценить эффективность внутрикостного введения антибиотиков для профилактики осложнений при лечении местнораспространённого рака слизистой оболочки полости рта.

Материал и методы

В исследование были включены 204 пациента, пролеченных в Астраханском областном онкологическом диспансере в 2003—2013 годах. Среди них было 194 мужчин и 10 женщин. Возраст варьировал от 35 до 70 лет. Больные были распределены по локализациям опухолей (табл. 1).

Условием включения в исследование явилось выполнение хирургического вмешательства по поводу местнораспространённого опухолевого процесса, которое проводилось после химиолучевой терапии с пластикой и ушиванием послеоперационной раны, без формирования плановой оростомы.

У всех пациентов диагноз был подтвержден гистологически. Изменение всех составляющих полости рта определялось путем ежедневного мониторинга не только онкологом, но и стоматологом. Такие симптомы, как изменение цвета слизистой оболочки, её отёчность и нарушение слюноотделения, были у всех пациентов. Достаточно характерным признаком была атрофия слизистой оболочки полости рта, которая отмечена у 93,1% больных.

Ангулярный стоматит наблюдался у 12 (13,8%) больных. В основном это были ослабленные пациенты, обременённые сопутствующей патологией или с распространёнными формами основного заболевания. Все остальные симптомы отмечались у подавляющего большинства из них. Иногда больных беспокоило чувство онемения слизистой оболочки, извращение вкусовых ощущений.

Как правило, с первых же дней назначения лучевой терапии больные ощущали сухость и жжение в полости рта. Для увеличения слюноотделения временно назначали полоскания полости рта 0,1—0,2% раствором йодистого калия, особенно в тех случаях, когда наблюдался радиационный паротит.

В период формирования деструктивных процессов сухость в полости рта сменялась обильным выделением вязкой и трудно эвакуируемой слюны, количество которой у некоторых пациентов доходило до 0,5—0,8 литров в сутки.

Предоперационное обследование и ведение в послеоперационном периоде было аналогичным для всех больных. Предоперационная лучевая терапия выполнялась в режиме классического фракционирования. При проведении химиотерапии использовалась комбинация препаратов цисплатина (или карбоплатина) и 5-фторурацила. Все больные были опе-

рированы с краевой резекцией нижней челюсти и закрытием дефекта слизистой оболочки и опилов нижней челюсти кожно-жировым или кожно-мышечным лоскутом; Инфекционные осложнения в результате проведённого лечения отмечены у 104 пациентов (51%) и обусловлены в основном частичным некрозом кожно-мышечного или кожно-жирового лоскута после перенесённых различных форм мукозита. Остеомиелит нижней челюсти диагностирован у 12 больных (5,8%).

Все больные были разделены на 2 группы. Контрольную группу составили 101, исследуемую — 103 человека. Пациенты опытной и контрольной групп были сопоставимы по возрасту — средний возраст $57,7 \pm 8,4$ и $55 \pm 7,9$ года, полу — доля мужчин составила 98,1 и 91,1%, по методике и объёму предоперационной химиолучевой терапии, сопутствующей патологии.

Таким образом, группы пациентов оказались сопоставимы по сравнимым критериям (возраст, пол, объём операций, распространённость опухолевой патологии, предоперационное лечение и др.).

Результаты исследований

С целью профилактики осложнений нами предложен комплекс профилактических мероприятий, который определялся совместно со стоматологом, проводившим мониторинг в процессе лечения этого контингента больных. В основе всех профилактических мероприятий в опытной группе лежит правильная диагностика имеющихся нарушений со стороны составных компонентов полости рта, которая предусматривает индивидуальное планирование лечебно-профилактического воздействия на организм в целом и на слизистую оболочку в частности.

Пациентам, поступающим для проведения химиолучевой терапии, как правило, удавалось предварительно осуществить санацию полости рта с удалением зубных отложений, пломбированием кариозных полостей, удалением некачественных протезов, а при необходимости — экстракцией зубов. В комплексе профилактических мероприятий, помимо общеизвестных препаратов и методов стоматологического и общего лечения больных, мы использовали реамберин, который применяли местно в виде полоскания от 3 до 6 раз в сутки; а при выраженных клинических проявлениях вводили его внутривенно непосредственно до применения химиопрепаратов и лучевой терапии и в процессе лечения в зависимости от эффекта.

Местно также использовали препарат иммуностимулирующего действия «Алфит» и аэрозольный антибиотик «Биопарокс», действующим началом которого является фузафунжин, обладающий двойными свойствами антибиотика и противовоспалительного средства.

Анализ непосредственных результатов лечения показал, что при обширных комбинированных операциях мы получили достаточно высокий процент послеоперационных осложнений. Однако эти осложнения преобладали у тяжёлого контингента больных, имеющих, помимо основного заболевания, сопутствующие патологии, отягощённых

Таблица 1. Распределение пациентов по локализациям опухоли

Локализация опухоли	Контрольная группа (n=101)		Исследуемая группа (n=103)	
	абс.	%	абс.	%
Язык	30	29,7	26	25,3
Дно полости рта	32	31,8	34	33,0
Альвеолярный отросток	12	11,8	10	9,7
Ретромолярная область	9	8,9	12	11,6
Щека	18	17,8	21	20,4
Итого	101	100	103	100

большим объёмом удаляемых тканей, проведением высоких доз лучевой терапии на зоны хирургического вмешательства, последствиями полихимиотерапии и рядом других причин. Определённую роль играли осложнения, связанные с воспалением слизистой оболочки, возникающие при проведении цитостатической и лучевой терапии. Правильное проведение профилактических и лечебных мероприятий способствовало снижению явлений мукозита и купированию основных его проявлений на более ранних стадиях развития.

Ретроспективный анализ историй болезней и осмотр больных в раннем послеоперационном периоде позволил нам выявить определённую закономерность в развитии гнойных осложнений со стороны послеоперационной раны в зависимости от состояния слизистой оболочки полости рта. При наличии мукозита I—II степени до операции этих осложнений было более чем в 2 раза меньше: в контрольной группе — у 47 (46,52%) больных, в опытной группе они имели место у 24 (23,3%) больных.

Для профилактики гнойных осложнений, остеомиелита в том числе, мы вводили антибиотики непосредственно в нижнюю челюсть у исследуемой группы больных (n — 103). Одновременно в этой группе применялся реамберин местно и внутривенно.

При использовании внутрикостного введения антибиотиков мы руководствовались концепциями об особенностях распространения опухоли и инфекционного процесса на нижнюю челюсть. Примерно у половины здоровых людей лимфатический отток со слизистой оболочки дна полости рта осуществляется через надкостницу нижней челюсти. Это является частой причиной раннего прирастания опухоли к челюсти, хотя прорастание в кость в большинстве случаев не наблюдается.

При разрушении надкостницы очень быстро происходит перфорация нижнего альвеолярного канала, особенно при вторичной полной адентии, когда наступает атрофия альвеолярного отростка и канал располагается в непосредственной близости от жевательной поверхности и находится примерно на уровне дна полости рта. В последующем из-за перифокального воспаления вокруг опухоли образуется единая непрерывная связь между опухолью, слизисто-надкостничным

слоем нижней челюсти и костно-мозговым пространством в местах, где имеются кортикальные микродефекты. Указанные анатомические особенности диктуют необходимость местного использования антибиотиков с созданием больших концентраций препарата в костномозговом пространстве и надкостнице. При внутрикостном введении лекарственных веществ создаются высокие терапевтические концентрации препарата в очаге поражения, включая и костную ткань.

Для этих целей нами предложено и внедрено «Устройство для внутрикостного введения лекарственных веществ в нижнюю челюсть» (Патент на изобретение №2203100 по заявке №2001106724/14 от 11.03.2001 г.).

Эта система состоит из специально подобранных игл различных по диаметру и конфигурации, а также проводника-фиксатора. Рабочая часть иглы имеет резьбу для ввинчивания её в костную ткань, что позволяет плотно фиксировать иглу и исключает подтекание препарата. Головка иглы своей внутренней частью строго подогнана к канюле шприца и имеет два паза, за счёт которого происходит её вращение.

При вращении проводника происходит вворачивание иглы на нужную глубину. Проводник-фиксатор имеет на конце шилообразный мандрен, плотно входящий в просвет иглы. Конец мандрена выступает из просвета иглы на 0,2—0,3 см и остро заточен, что позволяет одновременно выполнять функцию сверла. За счёт этого игла свободно входит в костную ткань. При вворачивании иглы на нужную глубину проводник-фиксатор извлекается, а игла остается в нижней челюсти на необходимое время. Учитывая длительное (до 5—7 дней) и стойкое нахождение иглы в кости, возможно многократное введение антибиотиков в течение дня. Можно полагать, что при внутрикостном введении антибиотиков концентрация препарата в очаге поражения увеличивается в десятки, а то и сотни раз. При введении раствора в губчатое вещество кости цитостатик проникает не только в кровяное русло, но и в самые истоки лимфатического аппарата, а через них в лимфатические сосуды и регионарные лимфатические узлы. Внутрикостное введение антибиотиков в растворе новокаина отвечает принципам нейротропно-патогенетической и этиотропной терапии.

Таблица 2. Частота и вид послеоперационных осложнений

Локализация опухоли	Контрольная группа (n=101)		Исследуемая группа (n=103)	
	абс.	%	абс.	%
Нагноение в области послеоперационного шва	26	25,7	14	13,2
Свищи	12	11,9	7	6,8
Мукозит III—IV ст.	21	20,7	12	11,6
Остеомиелит	9	8,9	3	2,9

Осложнений в этой группе больных не было. Таким образом, анализ непосредственных результатов показал целесообразность проведения адекватной индивидуализированной предоперационной подготовки в комплексе с внутрикостным введением антибиотиков.

Всем больным проводилась профилактическая антибиотикотерапия в следующих режимах: линкомицин (клиндамицин) внутримышечно + цефабол внутрикостно всем больным (вторая группа).

В первой группе больных применялось только внутримышечное введение тех же антибиотиков. Частота местных раневых осложнений приведена в табл. 2.

Если в первой группе нагноения были 26 (25,7%) больных, а остеомиелит — у 9 (8,9%) больных, то во второй группе их было 14 (13,2%) и 3 (2,9%) соответственно. Разница статистически не достоверна ($p>0,05$).

Обсуждение результатов

При выполнении операций у онкологических больных выявлен ряд специфических особенностей, осложняющих проведение хирургического этапа лечения. Одной из главных причин этого является проводимое перед операцией специальное противоопухолевое лечение: воздействие различных вариантов лучевой и лекарственной терапии, оказывающих влияние на частоту послеоперационных осложнений. Профилактика этих осложнений, проводимая совместно со стоматологом, способствует улучшению результатов лечения.

Оперативные вмешательства, выполняемые в полости рта, сопровождаются контаминацией окружающих тканей, что создает дополнительную опасность в плане риска возникновения по-

слеоперационных гнойных осложнений. Вопросами профилактики этих осложнений следует уделять особое внимание, так как поддержание раны в процессе операции в стерильном состоянии практически невозможно. Несмотря на то что необходимость периоперационной антибиотикопрофилактики у данной категории больных сомнений не вызывает, остаются вопросы относительно выбора антибактериальных препаратов, их комбинаций, режимов и способов их введения. Особого рассмотрения требуют вопросы внутрикостного введения антибиотиков.

Таким образом, для адекватной профилактики инфекционных осложнений при комбинированном и комплексном лечении рака слизистой полости рта целесообразно проведение стоматологических мероприятий, как до начала специального лечения, так и в процессе его. Установлено, что использование внутрикостного введения антибиотиков было наиболее эффективным в профилактике раневой инфекции у данной категории больных.

Выводы

1. Для профилактики инфекционных осложнений при лечении больных раком слизистой полости рта рекомендуется постоянный мониторинг стоматологом в процессе всего лечения этого контингента больных.
2. Профилактика и лечение мукозита после лучевой и цитостатической терапии с использованием реамберина у больных, готовящихся к операции, способствует снижению инфекционных осложнений со стороны послеоперационной раны.
3. Пролонгированное внутрикостное введение антибиотиков в нижнюю челюсть позволяет снизить число гнойных осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М. И., Аксель Е. М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями. Вестн РОНЦ им. Н. Н. Блохина 2010; 2: 21: 58—59.
2. Козлова С. Н., Козлова Р. С. Антибактериальные препараты в клинической практике. М.: 2009, 146—155.
3. Святославов Д. С. Этиологическая структура раневых инфекций у больных опухолями головы и шеи. Антибиотики и химиотер 2006; 11—12: 36—44.
4. Матякии Е. Г., Кропотов М. А. Сборник тез: Онкология на рубеже XXI века. Возможности и перспективы. М.: 1999: 231.
5. Пачес А. И. и др. Злокачественные опухоли полости рта, глотки и гортани. М.: Медицина, 1998; 304.
6. Jatin P., Shah J. P. Role of surgery and the surgeon in the treatment of head and neck tumors. Oncosurgery 2009; 1: 2: 12.

7. Leemans R. Oral Cancer. Международный конгресс «Современные аспекты хирургии и онкологии головы и шеи». СПб.: 2010; 43—46.
8. Olmi P., Crispino S., Fallai C. et al. Locoregionally advanced carcinoma of the oropharynx: conventional radiotherapy vs. accelerated hyperfractionated radiotherapy vs. concomitant radiotherapy and chemotherapy — a multicenter randomized trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 55: 1: 78—92.
9. Pignon J., Bourhis J., Domenge C. et al. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous cell carcinoma: Three metaanalysis of updated individual data. MACHNC collaborative group. Metaanalysis of chemotherapy on head and neck cancer. Lancet 2000; 355:3: 949—955.
10. Toth B., Chambers M.S., Fleming F. Prevention and management of oral complications associated with cancer therapies radiotherapy (chemotherapy). Texas Dent J 1996; 113: 6: 23—29.

Доклиническое изучение влияния лекарственных средств на активность цитохрома P450 и прогнозирование субстратной принадлежности как способ прогнозирования безопасности применения комбинированной терапии

Е. В. ФОМИН¹, И. Х. БАЙЧОРОВ², Е. В. ШИХ³, Ж. М. СИЗОВА³

¹ ФГБУ Научный Центр Экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

² ГБУЗ Городская поликлиника №2 Департамента здравоохранения г. Москвы

³ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Preclinical Investigation of Pharmaceuticals Impact Against Cytochrome P450 Activity and Prognosis of Substrate Affinity as Means for Providing Substrate Therapy Safety

E. V. FOMIN, I. H. BAYCHOROV, E. V. SHIH, ZH. M. SIZOVA

Scientific Centre for Examination of Medicinal Product, Moscow

Municipal Polyclinic No. 2, Moscow

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

Антидепрессанты трициклической группы, не влияющие на активность P450 3A4, являются максимально безопасными при сочетании с лекарственными средствами других групп, применяемых для лечения коморбидных состояний. Одним из наиболее широко применяемых в клинической практике является препарат Азафен. В проведённом электрохимическом исследовании *in vitro* показано, что пипофезин (азафен) не является субстратом, индуктором и/или ингибитором изоферментов цитохрома P450 CYP3A4. Компьютерное моделирование, проведённое с использованием программы Gusar, а так же данные литературы говорят о субстратной принадлежности пипофезина к CYP1A2.

Ключевые слова: взаимодействие лекарственных средств, пипофезин, метаболизм, субстраты, индукторы и ингибиторы изоферментов цитохрома P450 3A4; P450 1A2, электрохимический метод.

Tricyclic antidepressants, not influencing the P450 3A4 activity, are safe in combination with drugs of other groups used in the treatment of comorbid patients. Azaphen is one of the agents most widely used in the clinical practice. The *in vitro* electrochemical analysis showed that pipofezin (azaphen) was not a substrate, inducer, and/or inhibitor of cytochrome P450 CYP3A4 isoenzymes. The Gusar programme computer modelling and the literature data demonstrated the substrate affinity of pipofezin to CYP1A2.

Keywords: drug interactions, pipofezin, metabolism, substrates, inducers and inhibitors of cytochrome isoenzymes P450 3A4; P450 1A2, electrochemical method.

Введение

Назначение комплексной терапии с учетом данных по метаболизму лекарственных препаратов как перспективный путь повышения безопасности фармакотерапии. При назначении комбинированной терапии у коморбидных пациентов необходимо учитывать пути метаболизма лекарственных препаратов, что позволит заранее спрогнозировать нежелательные взаимодействия и повысить безопасность проводимой комплексной терапии.

Одной из основных современных тенденций в медицине при назначении комплексной фар-

макотерапии является минимизация побочных эффектов. Это достигается путём персонализации пациента и «его» болезни. Персонализированная медицина — это методология медикаментозного лечения заболеваний на основе знания биологических особенностей человека. Инструментами персонализированной медицины являются генетическое тестирование (фармакогенетика и фармакотранскриптомика) и определение биомаркёров (фармакопротеомика и фармакометаболика). Фармакометаболика — изучение активности ферментов биотрансформации и транспортёров [1].

В табл. 1 приведены основные ферменты метаболизма лекарственных препаратов, применяемых для лечения депрессивных состояний, и ле-

© Коллектив авторов, 2013

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

Таблица 1. Основной фермент метаболизма лекарственных препаратов, применяемых для лечения депрессивных состояний и лекарственные препараты других групп, изменяющие их активность

Фермент	Субстрат	Ингибитор	Индуктор
CYP1A2	<i>Антидепрессанты:</i> амитриптилин*, кломипрамин*, дулоксетин, флувоксамин, имипрамин*, миртазапин. <i>Нейролептики:</i> клозапин, галоперидол, оланзапин. <i>Разные препараты:</i> кофеин, R-варфарин.	Ципрофлоксацин Флувоксамин	Карбамазепин Фентоин Рифампицин Курение
CYP2C19	<i>Антидепрессанты:</i> амитриптилин*, циталопрам, кломипрамин*, эсциталопрам, имипрамин*. <i>Разные препараты:</i> диазепам, омепразол, фентоин, пропанолол.	Флувоксамин Омепразол	Барбитураты Карбамазепин Фентоин Рифампицин
CYP2D6	<i>Нейролептики:</i> арипипразол, клозапин, галоперидол, оланзапин, перфеназин, рисперидон <i>Бета-блокаторы:</i> метопролол, пропанолол. <i>Разные препараты:</i> атомоксетин, кодеин.	Дулоксетин Флуоксетин Пароксетин	Не известны
CYP3A4	<i>Антидепрессанты:</i> амитриптилин*, циталопрам, кломипрамин*, эсциталопрам, имипрамин*, миртазапин, сертралин, венлафаксин. <i>Нейролептики:</i> арипипразол, клозапин, галоперидол, кветиапин, рисперидон, zipрасидон <i>Бензодиазепины:</i> алпразолам, клоназепам, диазепам, миртазолам. <i>Блокаторы кальциевых каналов:</i> дилтиазем, нифедипин, верапамил <i>Иммуносупрессоры:</i> циклоспорин. <i>Разные препараты:</i> амиодарон, карбамазепин, кларитромицин, эритромицин.	Эритромицин Кетоконазол	Барбитураты Карбамазепин Фентоин Рифампицин

Примечание. * — деметилирование; ** — гидроксילирование.

карственные препараты других групп, изменяющие их активность.

Совершенствование схем психофармакотерапии депрессий с максимально оптимизирующим подбором лекарственных средств приобретает всё большую актуальность. Нежелательные реакции при комбинации психотропных средств с лекарственными препаратами других групп у коморбидных больных, особенно старших возрастных групп, — а именно такие чаще обращаются к врачам первичного звена, — как правило, возникают чаще и проявляются интенсивнее, чем у более молодых пациентов [2, 3].

Большинство лекарственных препаратов, применяемых для лечения соматических заболеваний, метаболизируются изоферментом CYP3A4. Для исключения возможного взаимодействия на уровне этого изофермента цитохрома целесообразно выбрать в качестве антидепрессанта у пациентов, принимающих другую лекарственную терапию, лекарственные средства, которые метаболизируются другим изоферментом цитохрома P-450.

Азафен как один из наиболее безопасных препаратов для лечения депрессивных состояний у коморбидных пациентов. Одним из наиболее широко применяемых антидепрессантов в амбулаторной практике и в стационарах является отечественный препарат Азафен. Азафен (пипофезин) — антидепрессант трициклической группы, обладает отчётливым антисеротонинергическим действием; холинолитическая активность практически отсутствует. Азафен относит-

ся к «малым» антидепрессантам и сочетает в себе умеренный тимоаналептический и седативный (транквилизирующий) эффекты. Использование азафена может быть предпочтительно при состояниях, протекающих со снижением настроения в сочетании с астенической и другой невротоподобной симптоматикой, что делает его интересным для использования в общетерапевтической амбулаторной практике, где депрессии часто носят невротический характер [4].

Нами проанализировано 152 случая применения препарата азафен у больных, страдающих депрессией и принимающих лекарственные препараты по поводу различных заболеваний внутренних органов. Выявлено 540 комбинаций лекарственных средств. Комбинация азафена с лекарственными средствами — субстратами CYP3A4 встречалась наиболее часто — в 326 случаях (60,1%); ингибиторами CYP3A4 — в 34 случаях (6,4%); с индукторами CYP3A4 — в 15 случаях (2,7%); с лекарственными средствами — субстратами CYP2D6 — в 89 случаях (16,5%); субстратами CYP2C9 — в 56 случаях (10,4%); с субстратами CYP1A2 — в 3 случаях (0,5%); с ингибиторами CYP2D19 — в 12 случаях (2,2%), ингибиторами CYP2D6 — в 5 случаях (0,9%) (рис. 1).

В связи с широким применением азафена в составе комплексной терапии коморбидных пациентов, совместно с ФГБУ НИИ Биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича было проведено экспериментальное электрохимическое изучение влияния пипофезина на активность системы цитохрома CYP3A4.

Материал и методы

Электрохимические исследования проводили совместно с ФГБУ НИИ Биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (лаборатория биоэлектрохимии, проф. Шумянцева В. В.). Использовали потенциостат/гальваностат PGSTAT12 AUTOLAB («Eco Chemie», Нидерланды), снабжённый программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре. Электрохимические исследования цитохрома P450 3A4 проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4. В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП «ЭЛКОМ», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами (графит фирмы Achison), и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного Ag/AgCl электрода сравнения.

Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости развёртки от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА, восстановление, аэробные условия): начальный потенциал +100 мВ, конечный потенциал — 600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота 10 Гц.

Реагенты. В работе использовали следующие реактивы: дидецилдиметиламмоний бромид (DDAB), $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, боргидрид натрия — фирмы Sigma-Aldrich, диклофенак и итраконазол («Новартис АГ»), азафен (Макиз-Фарма, Москва).

В электрохимических экспериментах использовали свежеприготовленные растворы 10 мМ диклофенака в дистиллированной воде, и 10 мМ итраконазол в диметилсульфоксиде, 10 мМ азафен в дистиллированной воде.

Коллоидный раствор золота, стабилизированный DDAB в хлороформе, был охарактеризован спектрально: $\lambda_{\text{max}} = 520$ нм.

Рекомбинантный P450 3A4 (165 М) был любезно предоставлен С. А. Усановым (Институт биоорганической химии, Минск, Республика Беларусь). Концентрацию цитохрома P450 3A4 определяли по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{450} = 91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Приготовление электродов. На поверхность рабочего графитового электрода наносили 2 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0,1 М DDAB в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл цитохрома P450 3A4. Электроды оставляли на 12 часов при +4°C во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

Азафен ($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}$) — навеска 3 мг/мл воды — исходный (10 М раствор); добавление 1 мкл (в пробе 10 мкМ); добавление 10 мкл (в пробе 100 мкМ).

Для исследования влияния лекарственных препаратов на активность цитохрома P450 3A4 были проведены эксперименты в системах электрод/цитохром P450 3A4 [5–7]. Электрохимические подходы перспективны для исследования фермент-субстратных взаимодействий вследствие высокой чувствительности. Особенностью электрохимических сенсоров на основе цитохромов P450 является использование наноструктурированных электродов для повышения чувствительности анализа.

Для исследования электроаналитических характеристик используют вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии и вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой и дифференциальной импульсной вольтамперометрии). Субстраты соответствующих форм цитохромов P450 вызывают существенное повышение каталитического тока при контролируемом напряжении, а ингибиторы не изменяют или снижают максимальные амплитуды токов [8].

Наночастицы золота, стабилизированные синтетическим мембраноподобным веществом бромидом дидецилдиметиламмония (DDAB), обеспечивают эффективный электронный транспорт между графитовым электродом и гемом цито-

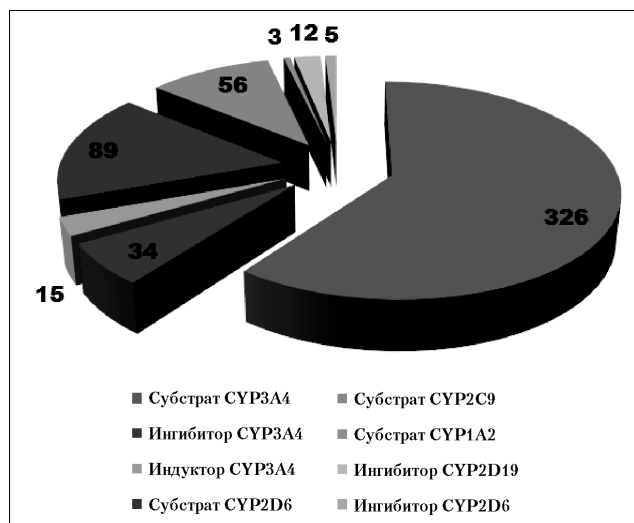


Рис. 1. Анализ частоты встречаемости комбинаций азафена с другими лекарственными средствами с точки зрения их метаболизма

хромов P450. Мембрана синтетического липида с коллоидным золотом DDAB/Au содержит достаточное количество воды для поддержания структуры гемопroteинов и обеспечивает фиксацию ферментов на графитовом печатном электроде. Ранее было показано [9], что DDAB/Au/P450 2B4, DDAB/Au/P450 1A2, DDAB/Au/P450 51b1 электроды имеют стабильные электрохимические параметры, что позволяет использовать такие химически модифицированные электроды в качестве сенсоров при исследовании субстратов и (или) ингибиторов этих форм цитохромов P450. Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450, т.к. метаболизирует 225 субстратов, из которых 191 вещество является лекарствами, а из 97 ингибиторов этой формы — 87 соединений являются лекарствами. Цитохром P450 3A4 участвует в метаболизме 34% применяемых лекарственных препаратов [10–13].

При модификации поверхности печатных графитовых электродов 0,1 М DDAB/Au в хлороформе с последующим включением в мембраноподобную матрицу цитохрома P450 3A4 наблюдается прямой безмедиаторный перенос электронов между электродом и гемом. DDAB/Au/P450 3A4 электроды электроактивны при нанесении пикомолярных количеств фермента на электрод. По данным цикловольтамперометрии электроактивны 10–15% молекул цитохрома P450 3A4, что составляет 16–20 пмол/электрод.

Результаты и обсуждение

Для исследования электроаналитических характеристик использовали вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии и вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой вольтамперометрии КВВА). На рисунках 2 и 3 представлены цикловольтамперограммы и квадратно-волновые вольтамперограммы DDAB/Au/P450 3A4 электрода до, и после прибавления азафена (100 мкМ). Как следует из полученных экспериментальных данных, азафен не провоцирует увеличение каталитического тока цитохрома P450 3A4, что доказывает отсутствие субстратных свойств этого препарата по отношению к цитохрому P450 3A4

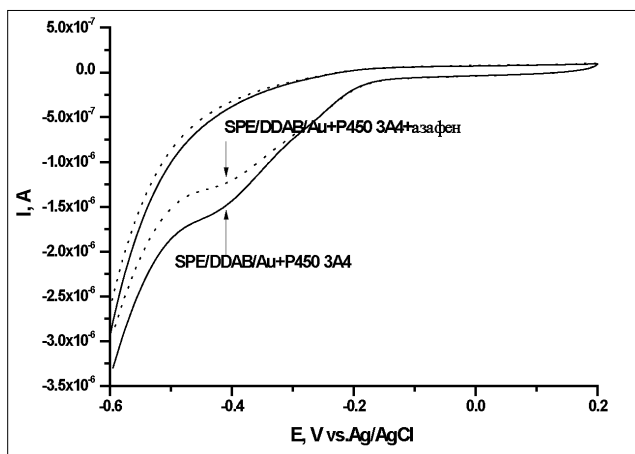


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы электродов DDAB/Au/P450 3A4 (–) и DDAB/Au/P450 3A4 + 100 мкМ азафен.

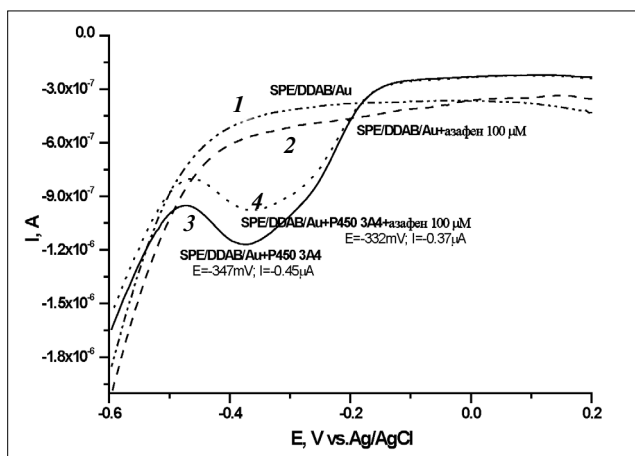


Рис. 3. Квадратно-волновые вольтамперограммы электродов:

1 – DDAB/Au; 2 – DDAB/Au + 10 мкл азафена (в пробе 100 мкМ); 3 – DDAB/Au/3A4 (пик на -347 мВ, высота пика $-4,53 \times 10^{-7}$ (-0.45 μА); 4 – DDAB/Au/3A4 + 10 мкл азафена (в пробе 100 мкМ) пик на -332 мВ, высота пика $-3,71 \times 10^{-7}$ (-0.37 μА).

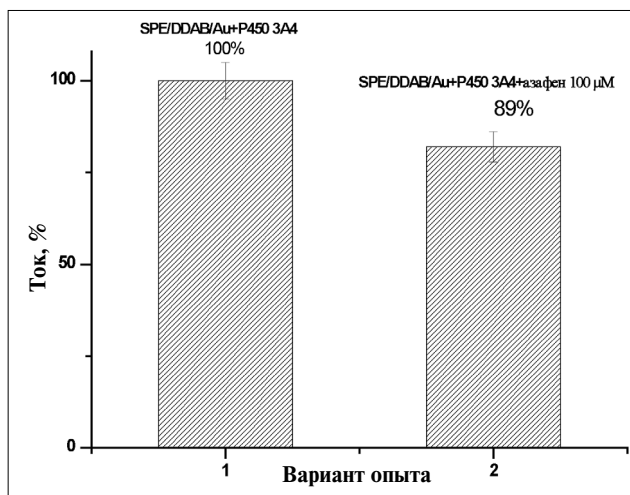


Рис. 4. Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1), DDAB/Au/P450 3A4+азафен (100 мкМ) (см. табл. 2). Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии.

1 – 2 μl DDAB/Au/1 μl 3A4 пик на -347 мВ, высота пика $-4,53 \times 10^{-7}$ (-0.45 μА); 2 – 2 μl DDAB/Au/1 μl 3A4 + 10 мкл азафена (в пробе 100 мкМ) пик на -332 мВ, высота пика $-3,71 \times 10^{-7}$ (-0.37 μА).

(табл. 2). Азафен не дает восстановительных пиков в исследуемой области потенциалов (рис. 2) при использовании DDAB/Au электродов без цитохрома P450.

Максимальные амплитуды токов КВВА, скорректированные по базовой линии, для ферментативных электродов без азафена и в присутствии азафена приведены на рис. 4.

Подсчитано среднее значение катодного пика в присутствии азафена: $89 \pm 7\%$, (RSD = 7%, n=6). Азафен в концентрации 10–100 мкМ не дает увеличение катодного восстановительного пика цитохрома P450 3A4, что свидетельствует об отсутствии субстратных свойств этого лекарственного препарата.

Было исследовано влияние лекарственного противовоспалительного препарата диклофена-

Таблица 2. Высота катодного пика квадратно-волновых вольтамперограмм для электродов DDAB/Au/P450 3A4 и для электродов в присутствии 100 мкМ азафена

Система	Значение тока (μА)	Значение тока (%)
3A4	-0,453	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,371	82
3A4	-0,457	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,437	96
3A4	-0,633	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,554	87
3A4	-0,491	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,441	90
3A4	-0,491	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,449	91
3A4	-0,412	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,385	93

Таблица 3. Высота катодного пика квадратно-волновых вольтамперограмм для электродов DDAB/Au/P450 3A4 и для электродов в присутствии 100 мкМ азафена, и азафена и диклофенака

Система	Значение тока (µА)	Значение тока (%)
3A4	-0,457	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,437	96
3A4+ Азафен +Диклофенак (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,531	116
3A4	-0,633	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,554	87
3A4+ Азафен +Диклофенак (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,646	102
3A4	-0,491	100
3A4+Азафен (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,441	90
3A4+ Азафен +Диклофенак (исх.10 мМ) в пробе 100 мкМ	-0,650	132

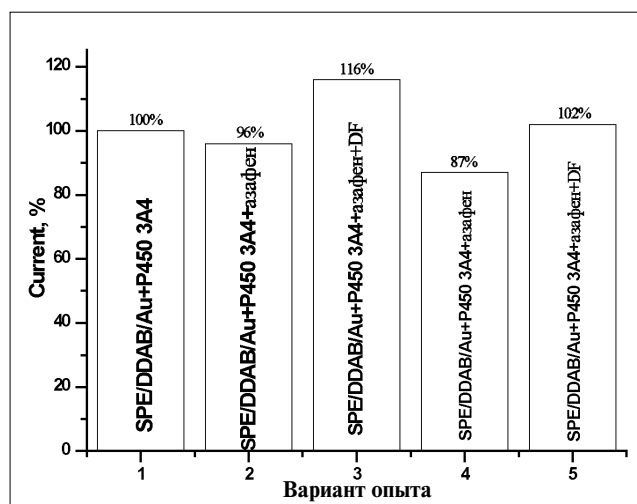


Рис. 5. Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1), DDAB/Au/P450 3A4 + азафен (100 мкМ) (2, 4), DDAB/Au/P450 3A4 + азафен (100 мкМ), затем 100 мкМ диклофенак (3, 5) (см. табл. 3).

Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии. 2 µl DDAB/Au/1 µl 3A4 + 10 µl азафена исх. 10 мкМ (в пробе 100 µM) +10 µl DF исх. 10 мкМ (в пробе 100 мкМ).

ка на цитохром P40 3A4 в присутствии азафена (табл. 3 и рис. 5). Азафен не ингибирует цитохром P450 3A4, так как диклофенак в системе цитохром P450 3A4/азафен четко увеличивает каталитический ток цитохрома P450 3A4, т. е. проявляет субстратные свойства.

Противогрибковый препарат итраконазол проявляет ингибирующие свойства по отношению к цитохрому P450 3A4 и в присутствии азафена, т. е. азафен не влияет на ингибирующую активность итраконазола (рис. 6).

Таким образом, в проведенном нами электрохимическом исследовании *in vitro* показано, что пипофезин (азафен) не является субстратом, индуктором и/или ингибитором изоферментов цитохрома P450 CYP3A4.

Прогнозирование субстратной принадлежности пипофезина по результатам компьютерного моделирования. Компьютерное моделирование прове-

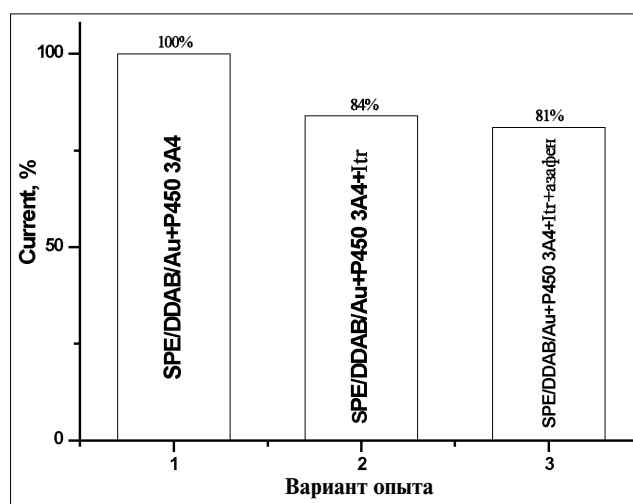


Рис. 6. Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1), DDAB/Au/P450 3A4 + итраконазол (10 мкМ) (2), DDAB/Au/P450 3A4 + итраконазол, затем азафен (100 мкМ), (3).

дено совместно с ФГБУ НИИ Биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (лаборатория структурно-функционального конструирования лекарств, проф. Поройков В. В.).

Структурная формула Азафена обнаружена в системе ChemIdPlus [14].

Структурная формула преобразована — удалено две молекулы соляной кислоты (рис. 7).

В дальнейшем для поиска информации в базах данных и для осуществления прогноза использовалась именно эта структурная формула. Нами был осуществлён поиск в имеющихся ис-

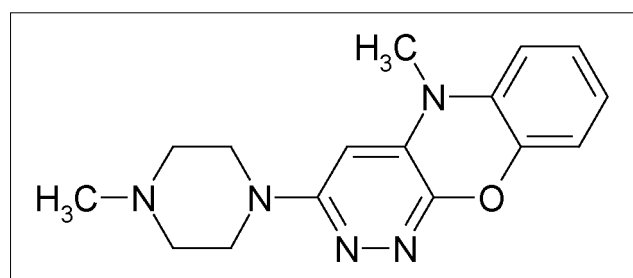


Рис. 7. Преобразованная структурная формула азафена

точниках информации. Были рассмотрены базы биотрансформаций и базы, описывающие взаимодействие веществ с цитохромами P450.

В базе данных, описывающей взаимодействие веществ с цитохромами P450, не было обнаружено записей, относящихся к молекуле Азафена.

С использованием программы GUSAR 2010.1 и созданных ранее компьютерных моделей для предсказания взаимодействия молекул с изоформами CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4 был осуществлён компьютерный прогноз принадлежности Азафена к субстратам или ингибиторам указанных выше изоформ. В результате прогноза предсказана принадлежность Азафена к субстратам CYP1A2.

Заключение

Электрохимическое исследование *in vitro* продемонстрировало, что пипофезин не является субстратом, индуктором и/или ингибитором изофермента 3A4 цитохрома P450. Компьютерное моделирование, проведённое с использованием программы Gusar, прогнозирует субстратную принадлежность пипофезина к CYP1A2. Назначение Азафена (пипофезина) в качестве антидепрессанта у пациентов с коморбидными заболеваниями при лечении которых используются лекарственные средства, метаболизирующиеся другими изоферментами цитохрома, не является прогностически опасным с точки зрения взаимодействия на уровне метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулес В. Г., Фисенко В. П., Стародубцев А. К., Раменская Г. В., Сычев Д. А., Андреев Д. А., Рейхарт Д. В. Метаболизм лекарственных препаратов / Под ред. В. Г. Кулеса, В. П. Фисенко М.: 2004.
2. Смуглевич А. Б. Депрессии в общей медицине. Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, 2001.
3. Сыркин А. Л., Медведев В. Э., Троснова А. П. и др. Терапия депрессивных расстройств в кардиологической практике. Психич расстр в общ мед 2007; 2: 28—31.
4. Зотов П. Б., Уманский М. С. Депрессия в общемедицинской практике (клиника, диагностика, лекарственная терапия). Методическое пособие для врачей. М.: 2006; 35.
5. Шумянцева В. В., Супрун Е. В., Булко Т. В., Добрынина О. В., Арчаков А. И. Сенсорные системы медицинского назначения на основе гемопротеинов и нанокompозитных материалов. Биомед хим 2010; 56: 55—71.
6. Makhova A. A., Shumyantseva V. V., Shich E. V., Bulko T. V., Kukes V. G., Sizova O. S., Ramenskaya G. V., Usanov S. A., Archakov A. I. Electroanalysis of cytochrome P450 3A4 catalytic properties with nanostructured electrodes: the influence of vitamin B group on diclofenac metabolism, DOI 10.1007/s12668-011-0007-4. BioNanoScience 2011; 1: 46—52.
7. Шумянцева В. В., Ших Е. В., Махова А. А., Булко Т. В., Кулес В. Г., Сизова О. С., Раменская Г. В., Усанов С. А., Арчаков А. И. Влияние витаминов группы В на монооксигеназную активность цитохрома P450 3A4: фармакокинетические исследования и электроанализ каталитических свойств. Биомед хим 2011; 57: 3: 343—354.
8. Шумянцева В. В., Булко Т. В., Кузнецова Г. П., Саменкова Н. Ф., Арчаков А. И. Анализ вольтамперных характеристик электродов с иммобилизованными цитохромами p450 для поиска субстратов и ингибиторов. Биохимия 2009; 74: 542—549.
9. Shumyantseva V. V., Bulko T. V., Archakov A. I. J Inorg Biochem 2005; 99: 1051—1063.
10. Archakov A. I., Bachmanova G. I. Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London. 1990.
11. R. Ortiz de Montellano. (1995) Cytochrome P450. Plenum press, New York, Second Edition.
12. Lewis D. F. V. (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function. London and New York.
13. <http://cpd.ibmh.msk.su> (База данных по цитохрому P450).
14. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>: NAME: Azaphen, RN: 24853-80-3.

Дискордантность статуса эстрогеновых рецепторов между первичным и метастатическим раком молочной железы — возможные причины и прогностическая значимость

Т. А. БОГУШ¹, А. С. ПОПОВА², Е. А. ДУДКО¹, Е. О. ИГНАТОВА¹,
Б. Е. ПОЛОЦКИЙ¹, С. А. ТЮЛЯНДИН¹, М. И. ДАВЫДОВ¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина»
Российской академии медицинских наук, Москва

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Discordance of Estrogen Receptor Status Between Primary and Metastatic Breast Cancer — Possible Reasons and Prognostic Value

T. A. BOGUSH, A. S. POPOVA, E. A. DUDKO, E. O. IGNATOVA, B. E. POLOTSKY, S. A. TJULJANDIN, M. I. DAVYDOV

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow
Department of Fundamental Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Целью данного обзора явилась систематизация сведений о дискордантности экспрессии эстрогеновых рецепторов в первичном и метастатическом раке молочной железы, в разных метастазах, при повторных анализах одной и той же ткани. Обсуждаются возможные причины этого феномена. Авторы подчеркивают необходимость проведения анализа эстрогеновых рецепторов в метастазах рака молочной железы, независимо от рецепторного статуса первичной опухоли, для прогнозирования течения метастатической болезни и адекватного лечения метастатической опухоли в строгом соответствии с её рецепторным статусом на момент лекарственной терапии. Проанализированы работы, цитированные в поисковой системе Pub Med до мая 2013 года.

Ключевые слова: дискордантность, эстрогеновые рецепторы, рак молочной железы, метастазы рака молочной железы, прогноз, терапия.

The aim of the review was systematization of the data on discordance in expression of estrogen receptors between primary and metastatic breast cancer, different metastases and repeated analyses of the same tissue. The possible reasons for the phenomenon are discussed. The authors emphasize the need to analyze estrogen receptors in breast cancer metastases, regardless of the receptor status of the primary tumor, for predicting the course of the metastatic disease and providing an adequate treatment of the metastatic tumor in strict accordance with its receptor status during drug therapy. The works cited in the search engine Pub Med to May 2013 were analyzed.

Key words: discordance, estrogen receptors, breast cancer, metastatic breast cancer, prognosis, therapy.

Введение

Эстрогены играют важную роль в возникновении и развитии рака молочной железы, при этом гормональная чувствительность ткани определяется наличием в ней эстрогеновых рецепторов. Эстрогеновые рецепторы являются важнейшей клеточной мишенью, воздействуя на которую можно не только контролировать процессы канцерогенеза, но и подавлять рост уже трансформированных опухолевых клеток. Блестящим подтверждением этого является результат многолетнего, с начала 1970-х гг., применения

первого таргетного препарата тамоксифена у больных раком молочной железы с положительным статусом эстрогеновых рецепторов в опухоли. Препарат позволяет значительно улучшить отдалённые результаты хирургического лечения, снижая риск рецидива заболевания и смертность больных, эффективен в качестве средства адъювантной терапии пациентов с эстроген-рецептор положительным раком молочной железы. Именно поэтому определение рецепторного статуса опухоли является общепринятой рутинной процедурой, выполнение которой необходимо для выбора правильной тактики лечения.

Однако, несмотря на проведение адъювантной терапии соответственно рецепторному подтипу первичной опухоли, примерно у 20% паци-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 115478, г. Москва, Каширское ш., 24.
РОНЦ им. Н. Н. Блохина

енток с ранним раком молочной железы возникает метастатическая болезнь. В таких случаях выбор дальнейшего лечения зачастую основывается на характеристиках первичной опухоли, в основном из-за сложности взятия образца из метастаза [1] и отсутствия единой тестовой методики [2], несмотря на то что в литературе накоплено достаточно данных об изменении молекулярных маркеров метастатических опухолей по сравнению с первичными. Для эстрогеновых рецепторов подобная дискордантность впервые была отмечена более чем 30 лет назад [3].

Учитывая тот факт, что статус эстрогеновых рецепторов в опухоли является общепринятым и безусловно доказанным прогностическим маркером течения заболевания и предиктивным маркером эффективности антиэстрогеновой терапии, целью написания данного обзора явилась систематизация сведений о дискордантности экспрессии эстрогеновых рецепторов в первичном и метастатическом раке молочной железы, в разных метастазах, при повторных анализах одной и той же опухоли, а также обсуждение возможных причин этого феномена. Проанализированы работы, цитированные в поисковой системе Pub Med до мая 2013 года.

Дискордантность статуса эстрогеновых рецепторов между первичным раком молочной железы, регионарными и отдалёнными метастазами

Оценка дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов с использованием биохимических методов. До середины 90-х годов для определения в опухоли эстрогеновых рецепторов (ЭР) применялись методы анализа, основанные на оценке клеточного уровня белков, связывающих эстрогены (так называемые неселективные биохимические радиолигандные методы). Свежзамороженный образец опухоли гомогенизировали и при центрифугировании получали неочищенный цитозоль. Далее проводили инкубацию с радиоактивным эстрадиолом- ^3H и после градиентного

центрифугирования определяли уровень эстрогеновых рецепторов по количеству свободной и связанной с белками цитозоля радиоактивной метки. Позднее стали чаще проводить анализ, при котором для разделения связанного и несвязанного эстрадиола применяли нагруженную декстраном угольную пыль.

В разных исследованиях использовали разные начальные уровни позитивности статуса эстрогеновых рецепторов в опухоли — от 3 до 10 фмоль/мг цитозольного белка, и разные детали проведения анализа [4]. В целом, методы анализа, основанные на связывании лиганда, являются технически сложными, в ряде случаев требуют использования радиоактивных реагентов, больших объемов свежзамороженной ткани. К тому же они характеризуются низкой чувствительностью и неспецифичностью, поскольку позволяют измерять лишь общую концентрацию эстрогеновых рецепторов, в том числе многочисленных продуктов их деградации, связывающих лиганд [5], что отражается на результатах сравнительной оценки эстрогеновых рецепторов в первичной опухоли и метастазах.

Как видно из табл. 1, уровень дискордантности в ранних исследованиях варьировал очень широко и достигал 50%. Одной из явных причин этого является выраженная вариабельность начального уровня положительного статуса эстрогеновых рецепторов в опухоли, принятого разными исследователями — 3, 5, 7 и 10 фмоль/мг цитозольного белка. В среднем, конверсия рецепторного статуса рака молочной железы отмечена в 31% исследованных опухолей. Видна тенденция к более частой смене в метастатической опухоли «позитивности» на отрицательный статус эстрогеновых рецепторов (в 18,3% случаев), по сравнению с противоположной дискордантностью (в 12,2% случаев).

Оценка дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов с использованием иммуногистохимических методов исследования. Введение в лабораторную практику для определения эстрогеновых рецепторов специфических антител первона-

Таблица 1. Уровни дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов (ЭР) в первичном и метастатическом раке молочной железы при использовании биохимических методов изучения цитозоля замороженных образцов ткани

Ссылки	Число больных	Уровень «позитивности» статуса ЭР (фмоль/мг)	Число больных (%)		Уровень дискордантности (%)
			+/-	-/+	
[3]	19	≥ 10	3 (15,8)	2 (10,5)	26,3
[6]	37	$> 3,0$	0 (0)	7 (18,9)	18,9
[7]	35	> 7	5 (14,3)	1 (2,9)	17,2
[8]	28	≥ 5	6 (21,4)	9 (32,1)	53,5
[9]	75	> 5	8 (10,7)	6 (8,0)	18,7
[10]	83	> 3	13 (15,7)	11 (13,3)	28,9
[11]	10	> 10	5 (50,0)	0 (0)	50,0
Средний уровень дискордантности	287		18,3%	12,2%	30,5%

начально было успешным только на срезах свежемороженой ткани, но совершенствование методов и получение новых видов специфических антител позволило проводить анализ и фиксированного формальдегидом опухолевого материала. Простота иммуногистохимического исследования, доступность относительно недорогих реагентов для рутинных исследований, возможность оценки малых образцов и уверенность в том, что оцениваются только опухолевые клетки, привело к тому, что метод получил повсеместное распространение для определения гормональных рецепторов [4].

В ранних иммуногистохимических исследованиях, как и при использовании биохимических методов, не было общепринятого пограничного уровня, относительно которого опухоль можно считать эстроген-рецептор положительной или отрицательной. Реакцию определяли как негативную (нет окрашивания), слабо положительную (несколько слегка окрашенных клеток) и положительную (средне- или сильноокрашенные клетки) [12]. В дальнейшем, было принято считать опухоль эстроген-рецептор положительной, если окрашивалось $\geq 10\%$ клеток, исходя из данных, что такие опухоли с большей вероятностью отвечают на гормональную терапию. В 2010 году были опубликованы рекомендации, целью которых явилась стандартизация проведения и оценки результатов иммуногистохимического анали-

за. Согласно этим рекомендациям опухоль признаётся эстроген-рецептор положительной, если окрашивается как минимум 1% клеток [4].

Результаты работ разных исследователей по оценке статуса эстрогеновых рецепторов в первичной и метастатической опухоли при пограничных положительных уровнях «позитивности» 1 и 10% представлены в таблице 2.

Первое, что обращает на себя внимание — тенденция к более частой конверсии рецепторного статуса первичного рака молочной железы по сравнению с метастазом как с положительного на отрицательный, так и с отрицательного на положительный, при пограничном уровне «позитивности» рецепторного статуса опухоли 10% в сравнении с 1%. Средний показатель конверсии в первом случае составил 23,3%, а во втором — 16,8%. При этом независимо от начального уровня «позитивности», отчетливо видно, что частота конверсии положительного рецепторного статуса в отрицательный приблизительно в 2 раза чаще, чем с отрицательного на положительный.

Помимо описанного способа характеристики эстрогенового статуса рака молочной железы существует шкала баллов Оллреда (баллы от 0 до 8 выставляют, исходя из суммы пропорций окрашенных клеток и интенсивности окраски), при которой позитивность рецепторного статуса находится в диапазоне от 3 до 8 баллов. С использованием этой шкалы проведено проспективное

Таблица 2. Уровни дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов (ЭР) в первичном и метастатическом раке молочной железы при использовании пограничного уровня «позитивности» 1% и 10%

Ссылки	Число больных	Локализация образцов*	Число больных (%)		Уровень дискор- дантности (%)
			+/-	-/+	
Пограничный уровень «позитивности» — 1%					
[13]	233	ОМ	23 (10,0)	12 (5,0)	15,1
[14]	140	РМ или ОМ	8 (5,7)	1 (0,7)	6,4
[15]	75	РМ или ОМ	16 (21,3)	11 (14,7)	36,0
[16]	99	ОМ	10 (10,1)	5 (5,1)	15,2
[17]	118	РМ или ОМ	10 (8,5)	4 (3,4)	11,9
[18]	94	ОМ	11 (11,7)	4 (4,3)	16,0
[19]	34	РМ или ОМ	5 (14,7)	1 (2,9)	17,6
Средний уровень дискордантности	793		11,7%	5,2%	16,9%
Пограничный уровень «позитивности» — 10%					
[1]	87	РМ	15 (17,2)	6 (6,9)	24,1
[20]	200	РМ или ОМ	39 (20,0)	21 (10,0)	30,0
[21]	75	РМ или ОМ	8 (10,7)	9 (12)	22,7
[22]	9	ОМ	4 (44,4)	1 (11,1)	55,5
[13]	233	ОМ	17 (7,3)	7 (3,0)	10,3
[23]	117	РМ или ОМ	12 (18,0)	7 (13,0)	31,0
[24]	262	РМ	12 (4,6)	7 (2,7)	7,3
[25]	26	ОМ	10 (38,5)	1 (3,8)	42,3
[2]	227	РМ или ОМ	10 (4,4)	7 (3,1)	7,5
[26]	97	РМ или ОМ или ИЛРМЖ	8 (8,2)	2 (2,1)	10,3
[27]	120	РМ или ОМ	11 (9,2)	8 (6,6)	15,8
[28]	119	РМ или ОМ	13 (10,9)	3 (2,5)	13,4
[29]	459	РМ или ОМ	113 (24,6)	36 (7,8)	32,4
Средний уровень дискордантности	2031		16,8%	6,5%	23,3%

Примечание. Здесь и в табл. 3: * — РМ — регионарные метастазы; ОМ — отдалённые метастазы; ИЛРМЖ — инсультальный рак молочной железы.

исследование статуса эстрогеновых рецепторов в первичном раке молочной железы в сравнении с отдалёнными и регионарными метастазами у 137 пациенток. В 10,2% случаев выявлена разнонаправленная дискордантность рецепторного статуса метастазов по сравнению с первичной опухолью, что привело к корректировке дальнейшей тактики лечения у 14 пациенток [30]. При аналогичной оценке статуса эстрогеновых рецепторов у 13 больных с метастатическим раком молочной железы смена позитивного на негативный рецепторный статус отмечена только у 1 больной [31].

По нашему мнению, важнейшим выводом анализа этого блока исследований, полученных при изучении образцов первичного рака молочной железы, регионарных и отдалённых метастазов разных локализаций у более 2500 пациенток, может служить заключение о возможной разнонаправленной конверсии эстрогенового статуса опухоли. Это каждая пятая или шестая пациентка, у которой в метастазе рака молочной железы по сравнению с первичной опухолью позитивный статус эстрогеновых рецепторов может поменяться на отрицательный и наоборот.

Использование разных антител при оценке дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов методом иммуногистохимии. Рассматривая дискордантность статуса эстрогеновых рецепторов в первичной и метастатической опухоли, описанную в работах, использовавших иммуногистохимические методы исследования, следует указать некоторые аналитические особенности, которые могут давать ложноотрицательные или ложноположительные результаты. Иммуногистохимическое определение, несмотря на упомянутые выше достоинства, является качественным и к недостаткам метода можно отнести отсутствие единых критериев позитивности рецепторного статуса опухолей, субъективность визуальной оценки рецепторного статуса, проводимой патоморфологами, и различия в иммунореактивности используемых антител. Последнее может являться одной из очевидных причин различий в оценке эстрогеновых рецепторов в первичной и метастатической опухоли с использованием разных антител.

Для иммуногистохимического анализа применяется достаточно широкий спектр моноклональных антител, производимых разными фирмами, реже — поликлональные антитела к эстрогеновым рецепторам. Во избежание терминологической путаницы, необходимо указать, что с 1996 года в связи с открытием нового типа рецепторов — эстрогеновых рецепторов β , «классические» рецепторы эстрогена получили название эстрогеновые рецепторы альфа ($\text{ER}\alpha$). Многие современные антитела позволяют строго квалифицировать эти два типа рецепторов и даже их

изоформы, но несмотря на это во многих работах, и особенно в клинической практике, $\text{ER}\alpha$ по-прежнему называют «эстрогеновые рецепторы».

В настоящее время для иммуногистохимической оценки статуса $\text{ER}\alpha$ наиболее часто используются мышиные антитела фирмы DAKO (клон 1D5), связывающиеся с аминотерминальным фрагментом молекулы $\text{ER}\alpha$, и мышиные антитела фирмы Novocastra (клон 6F11), специфичные к полноразмерной форме рецептора. В некоторых работах проводили окрашивание антителами обоих указанных клонов, и в случае расхождения результатов количество $\text{ER}\alpha$ -позитивных клеток, выявленных при помощи антител 1D5, обычно уступало таковому при использовании антител 6F11. Например, в одной из работ окрашивание клеток антителами 1D5 не выявило наличия $\text{ER}\alpha$, а при окрашивании препаратов тех же опухолей антителами 6F11 доля $\text{ER}\alpha$ -позитивных опухолей составила 67% [32]. В то же время по неизвестной причине антитела клона 6F11 не выявляют наличие цитоплазматических $\text{ER}\alpha$ [33]. В одном из последних исследований показана значительно меньшая иммунореактивность обоих широко используемых антител клонов 1D5 и 6F11 относительно кроличьих моноклональных антител фирмы Akris (клон SP1), специфичных к карбокситерминальному фрагменту $\text{ER}\alpha$, чья аффинность к рецептору в 8 раз выше [34, 35].

Таким образом, различные антитела реагируют против различных частей или эпитопов $\text{ER}\alpha$, имеют разную иммунореактивность, поэтому для исключения аналитической ошибки при проведении сравнительного анализа экспрессии $\text{ER}\alpha$ в первичной и метастатической опухоли вид антитела обязательно должен быть одинаковым.

В таблице 3 приведены данные сравнительной оценки результатов таких работ. Анализ $\text{ER}\alpha$ в первичном раке молочной железы, а также в регионарных и отдалённых метастазах проведён с использованием перечисленных выше специфических антител фирмы DAKO, Novocastra и Acris. Независимо от вида антитела прослеживается тенденция, описанная выше: количество случаев конверсии позитивного статуса $\text{ER}\alpha$ на негативный больше, чем противоположное изменение. При этом обращают на себя внимание значительные различия между показателями дискордантности у разных авторов при использовании одинаковых антител: для DAKO 1D5 — от 3 до 24%, для Novocastra 6F11 — от 7 до 42%, для антител Acris SP1 — от 6 до 18%. Как можно объяснить такие различия в аккуратно выполненных исследованиях — непонятно. Возможно, это связано с недостаточным количеством опухолевых образцов, включённых в исследование. Однако существование дискордантности между статусом эстрогеновых рецепторов в первичном раке

Таблица 3. Уровни дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов альфа (ЭР α) в первичном и метастатическом раке молочной железы при использовании разных видов специфических моноклональных антител

Антитела: фирма, клон, вид	Ссылки	Число больных	Локализация образцов*	Число больных (%)		Уровень дискор- дантности (%)
				+/-	-/+	
DAKO, 1D5, мышинные	[36]	117	PM	4 (6,7)	0 (0)	4 (6,7)
	[1]	87	PM	15 (17,2)	6 (6,9)	21 (24,1)
	[35]	278	PM или OM	9 (3,2)	0 (0)	9 (3,2)
	Средний уровень дискордантности	482		9,0%	2,3%	11,3 %
Novocastra, 6F11, мышинные	[21]	75	PM или OM	8 (10,0)	9 (12,0)	17 (22,0)
	[30]	137	PM или OM	11 (8,0)	3 (2,2)	14 (10,2)
	[25]	26	OM	10 (38,5)	1 (3,8)	11 (42,3)
	[2]	227	PM или OM	10 (4,4)	7 (3,1)	17 (7,5)
	Средний уровень дискордантности	465		15,2%	5,3%	20,5 %
	Acris, SP1, кроличьи[23]	117	OM	10 (14,0)	3 (4,0)	13 (18,0)
			PM	2 (4,0)	4 (9,0)	6 (13,0)
	[14]	140	PM или OM	8 (5,7)	1 (0,7)	9 (6,4)
	[17]	118	PM или OM	10 (8,5)	4 (3,5)	14 (12,0)
	[28]	119	PM или OM	13 (11,0)	3 (2,4)	16 (13,4)
	[18]	94	OM	11 (11,5)	4 (4,5)	15 (16)
	[19]	34	PM или OM	5 (14,7)	1 (2,9)	6 (17,6)
	Средний уровень дискордантности	622		9,9%	5,3%	13,8%

молочной железы, регионарными и отдалёнными метастазами очевидно.

Зависимость дискордантности между первичным раком молочной железы и метастазами от промежуточной терапии. В 1980 J. C. Allegra et al. продемонстрировали тенденцию к уменьшению концентрации эстрогеновых рецепторов в опухоли после лечения тамоксифеном — в среднем с 66 до 8 фмоль/мг [37]. Считалось, что тамоксифен связывает эстрогеновые рецепторы, меняя их статус с положительного на отрицательный.

Однако в более позднем исследовании было показано, что после проведения химио- или гормональной терапии у большего числа пациентов с ЭР-положительными опухолями диагностируются ЭР-негативные метастазы, чем у пациентов, которым промежуточная терапия не проводилась [7]. Эти результаты объяснялись тем, что тамоксифен мог селективно устранять ЭР-положительные клетки, вследствие чего более агрессивные ЭР-отрицательные клетки давали начало метастазам [38]. В то же время показано, что адъювантная химио-, лучевая и гормональная терапия значимого влияния на конкордантность эстрогенового статуса первичной и метастатической опухоли не оказывает [2, 10, 21]. Дальнейшие иммуногистохимические исследования подтвердили, что приём тамоксифена не является причиной дискордантности между эстрогеновым статусом первичной и метастатической опухоли [2, 14, 18, 20, 21].

Тем не менее некоторые исследования демонстрируют, что адъювантная терапия может явиться причиной конверсии рецепторного статуса. Так, среди пациенток, получавших адъювантно гормональное лечение, ЭР-положительный статус в первичной опухоли сменился на ЭР-отрица-

тельный в метастазах в 18%, а у больных, которым гормонотерапия не проводилась, — только в 4% случаев [23].

Показано также, что изменение рецепторного статуса с позитивного на негативный встречается значительно чаще в группе пациенток, получавших химиотерапию и/или гормональное лечение, чем при отсутствии лекарственной терапии, и среди пациенток, получивших химиотерапию, чем гормональное лечение [29]. Аналогичные результаты описаны в исследовании J. Jensen et al.: адъювантная гормонотерапия вызывала изменение статуса эстрогеновых рецепторов в метастазе по сравнению с первичной опухолью, причём чаще с положительного на отрицательный, чем наоборот [17].

В работе Y. Gong et al. проведено сравнение влияния разных гормональных препаратов на конкордантность статуса в первичном и метастатическом раке молочной железы. Изменение в метастазе ЭР α -положительного статуса первичной опухоли на ЭР α -отрицательный отмечено у 9 из 117 пациенток: в 13,3% случаев — при приёме тамоксифена; в 3,9% — при терапии тамоксифеном и ингибитором ароматазы; в 5,3% случаев — при лечении ингибитором ароматазы. Однако различия между группами сравнения не достигли статистической значимости, так же как и при сравнении уровня конверсии статуса ЭР α в зависимости от продолжительности гормонотерапии [2]. Таким образом, при оценке влияния гормональной, лучевой и химиотерапии на экспрессию ЭР α и дискордантность эстрогенового статуса первичной и метастатической опухоли результаты не всегда однозначны. По мнению авторов, причиной этого могут быть не только трудности в от-

боре групп сравнения, идентичных по схеме, дозовому и временному режиму химиотерапии, но и индивидуальные различия в чувствительности опухоли к лекарственному воздействию, связанные с возрастом и клиническим статусом больного, гистологической структурой опухоли и т.д.

Влияние дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов между первичной и метастатической опухолью на выживаемость больных. При сравнительной оценке течения болезни в группах пациентов с разным соотношением статуса эстрогеновых рецепторов в первичной и метастатической опухоли отмечен худший клинический исход в случае конверсии показателя в сравнении с конкордантностью: медиана продолжительности безрецидивного периода составила 27 и 50 мес. ($p=0,01$), а общей выживаемости — 59 и 112 мес. ($p=0,0005$) соответственно. При этом средняя общая выживаемость для пациентов с изменением с ЭР-положительного на ЭР-негативный статус составила 59 мес., а при отсутствии конверсии ЭР-положительного статуса — 130 мес. ($p=0,001$) [28].

Показано также, что продолжительность безрецидивного течения болезни меньше в случаях, когда первичная опухоль ЭР-положительная, а метастаз — ЭР-отрицательный, чем у пациентов с изменением отрицательного рецепторного статуса на положительный — 28 и 51 мес. соответственно ($p=0,04$) [10]. Однако С. Iguchi et al. показали, что выживаемость пациентов с ЭР-положительной первичной опухолью значимо лучше по сравнению с пациентами с ЭР-отрицательной первичной опухолью ($p=0,0086$), но конверсия экспрессии ЭР в вовлечённых лимфатических узлах не коррелирует с выживаемостью [1].

У пациентов с ЭР-положительной первичной и метастатической опухолью медиана выживаемости почти в 2 раза больше в сравнении с отрицательной конверсией эстрогенового статуса (1131 и 669 дней, соответственно, $p<0,05$). Медиана выживаемости была значительно короче у пациентов с —/— статусом эстрогеновых рецепторов в первичной и метастатической опухоли соответственно (580 дней, $p<0,001$) по сравнению +/+ ($p<0,001$) или с —/+ рецепторным статусом (1131, $p<0,02$) [20].

В работе R. Macfarlane et al. отмечено увеличение продолжительности безрецидивного течения заболевания у больных с +/+ по сравнению с +/- рецепторным статусом первичной опухоли и метастаза — 4,2 года и 1,9 лет соответственно [39].

Таким образом, в литературе представлены убедительные данные, которые свидетельствуют, что дискордантность статуса эстрогеновых рецепторов в первичной и метастатической опухоли, в частности конверсия положительного статуса на отрицательный, является неблагоприятным прогностическим фактором течения рака молочной железы.

Заключение

Анализируя причины описанной дискордантности статуса эстрогеновых рецепторов между первичным и метастатическим раком молочной железы, между разными метастазами, при применении разных видов лечения и т.д., вновь можно вернуться к аналитическим ошибкам — к недостаткам иммуногистохимического анализа, связанного с субъективизмом оценки, с трудностью унификации условий фиксации, дегидратации, гидратации и т.д. В этом смысле очень показательна работа, в которой авторы провели повторное иммуногистохимическое исследование ранее изученного ими маркера репарации ERCC1 в 589 образцах немелкоклеточного рака лёгкого с теми же моноклональными антителами [40]. Дискордантность результатов достигла 36%, при этом, как и в случае с эстрогеновыми рецепторами, конверсия была не только отрицательной, что можно было бы объяснить неудовлетворительными условиями хранения опухолевых образцов, но и положительной.

Возможны разные варианты объяснения такого рода дискордантности результатов при повторном исследовании, включая колебания активности антител в разных партиях, а также гетерогенность опухоли по уровню экспрессии опухолевых маркеров, учесть которую при исследовании локального участка опухоли невозможно. Но в любом случае, очевидны безусловные методические недостатки, преодолеть или свести к минимуму которые можно, развивая инструментальные методы точной количественной оценки экспрессии опухолевых маркеров, исследуя максимально большое число клеток на панели из нескольких специфических антител к эстрогеновым рецепторам альфа с адекватным количеством положительных и отрицательных контролей. Считаем, что реализация такого подхода в рутинной клинической практике возможна при включении в иммунофлуоресцентный анализ метода проточной цитофлуориметрии [41, 42], который лишён субъективизма и позволяет одномоментное исследование суспензии клеток, полученных из разных участков опухоли с количественным инструментальным анализом 10 и более тысяч клеток. Чрезвычайная важность для точной молекулярной диагностики интегральной оценки уровня экспрессии маркеров по всему опухолевому узлу убедительно продемонстрирована в одной из последних работ [43]. При иммуногистохимическом исследовании 15 участков одного и того же образца немелкоклеточного рака лёгкого гетерогенность показателей экспрессии ERCC1, RRM1, TUBB-3 и Ki-67 выявлена у 33—67% больных.

Что касается необходимости анализа статуса эстрогеновых рецепторов в метастазах рака молочной железы, результаты представленных работ с определённой ясностью указывают, что делать это необходимо, независимо от рецепторного статуса

первичной опухоли. Во-первых, чтобы прогнозировать течение метастатической болезни не только в связи с рецепторным статусом первичной опухоли, но и ориентируясь на доказанную неблагоприятную прогностическую значимость конверсии положительного статуса первичной опухоли на отрицательный. Во-вторых, чтобы

провести лечение метастатической опухоли в строгом соответствии с её рецепторным статусом на момент лекарственной терапии. Авторы солидарны с высказыванием Андреа Л. Ричардсон на ASCO в 2010 году: «...мы должны лечить опухоль, существующую сейчас, а не опухоль, которая была годами ранее» [27].

ЛИТЕРАТУРА

1. Iguchi C., Nio Y., Itakura M. Heterogenic expression of estrogen receptor between the primary tumor and the corresponding involved lymph nodes in patients with node-positive breast cancer and its implications in patient outcome. *J Surg Oncol* 2003; 83: 2: 85–93.
2. Gong Y., Han E. Y., Guo M. et al. Stability of estrogen receptor status in breast carcinoma. *Cancer* 2011; 117: 4: 705–713.
3. Rosen P. P., Menendez-Botet C. J., Urban J. A. et al. Estrogen receptor protein (ERP) in multiple tumor specimens from individual patients with breast cancer. *Cancer* 1977; 39: 5: 2194–2200.
4. Hammond M. E. H., Hayes D. F., Dowsett M. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (Unabridged Version). *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 7: e48–e72.
5. Harvey J. M., Clark G. M., Osborne C. K., Allred D. C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 5: 1474–1474.
6. Hoehn J. L., Plotka E. D., Dickson K. B. Comparison of estrogen receptor levels in primary and regional metastatic carcinoma of the breast. *Ann Surg* 1979; 190: 1: 69–71.
7. Lee Y.-T. Variability of steroid receptors in multiple biopsies of breast cancer: effect of systemic therapy. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2: 2: 185–193.
8. Holdaway I. M., Bowditch J. V. Variation in receptor status between primary and metastatic breast cancer. *Cancer* 1983; 52: 3: 479–485.
9. Raemaekers J. M., Beex L. V., Koenders A. J. et al. Concordance and discordance of estrogen and progesterone receptor content in sequential biopsies of patients with advanced breast cancer: relation to survival. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; 20: 8: 1011–1018.
10. Li B. D. L., Byskosh A., Duda R. B., Molteni A. Estrogen and progesterone receptor concordance between primary and recurrent breast cancer. *J Surg Oncol* 1994; 57: 2: 71–77.
11. Shimizu C., Fukutomi T., Tsuda H. et al. C-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. *J Surg Oncol* 2000; 73: 1: 17–20.
12. Kamby C., Rasmussen B. B., Kristensen B. Oestrogen receptor status of primary breast carcinomas and their metastases. Relation to pattern of spread and survival after recurrence. *Br J Cancer* 1989; 60: 2: 252–257.
13. Hoefnagel L., van de Vijver M., van Slooten H.-J. et al. Receptor conversion in distant breast cancer metastases. *Breast Cancer Res* 2010; 12: 5: R75.
14. Bogina G., Bortesi L., Marconi M. et al. Comparison of hormonal receptor and HER-2 status between breast primary tumours and relapsing tumours: clinical implications of progesterone receptor loss. *Virchows Arch* 2011; 459: 1: 1–10.
15. Sari E., Guler G., Hayran M. et al. Comparative study of the immunohistochemical detection of hormone receptor status and HER-2 expression in primary and paired recurrent/metastatic lesions of patients with breast cancer. *Med Oncol* 2011; 28: 1: 57–63.
16. Botteri E., Disalvatore D., Curigliano G. et al. Biopsy of liver metastasis for women with breast cancer: impact on survival. *Breast* 2012; 21: 3: 284–288.
17. Jensen J., Knoop A., Ewertz M., Laenkholm A.-V. ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 2: 511–521.
18. Amir E., Miller N., Geddie W. et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 6: 587–592.
19. Romain P. St., Madan R., Tawfik O. W. et al. Organotropism and prognostic marker discordance in distant metastases of breast carcinoma: fact or fiction? A clinicopathologic analysis. *Hum Pathol* 2012; 43: 3: 398–404.
20. Lower E., Glass E., Bradley D. et al. Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90: 1: 65–70.
21. Guarneri V., Giovannelli S., Ficarra G. et al. Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. *Oncologist* 2008; 13: 8: 838–844.
22. Amir E., Ooi W. S., Simmons C. et al. Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2008; 20: 10: 763–768.
23. Idirisinghe P. K. A., Thike A. A., Cheok P. Y. et al. Hormone receptor and c-ERBB2 status in distant metastatic and locally recurrent breast cancer: pathologic correlations and clinical significance. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 3: 416–429.
24. Falck A.-K., Fernö M., Bendahl P.-O., Rydén L. Does analysis of biomarkers in tumor cells in lymph node metastases give additional prognostic information in primary breast cancer? *World J Surg* 2010; 34: 7: 1434–1441.
25. Hilton J. F., Amir E., Hopkins S. et al. Acquisition of metastatic tissue from patients with bone metastases from breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129: 3: 761–765.
26. Nishimura R., Osako T., Okumura Y. et al. Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World J Surg Oncol* 2011; 9: 131. doi: 10.1186/1477-7819-9-131
27. Ibrahim T., Farolfi A., Scarpi E. et al. Hormonal receptor, human epidermal growth factor receptor-2, and Ki67 discordance between primary breast cancer and paired metastases: Clinical Impact Oncology 2013; 84: 3: 150–157.
28. Dieci M. V., Barbieri E., Piacentini F. et al. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis. *Ann Oncol* 2013; 24: 1: 101–108.
29. Lindström L. S., Karlsson E., Wilking U. M. et al. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol* 2012; 30: 21: 2601–2608.
30. Thompson A., Jordan L., Quinlan P. et al. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the breast recurrence in tissues study (BRITS). *Breast Cancer Res* 2010; 12: 6: R92.
31. Koo J. S., Jung W., Jeong J. Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. *Tumori* 2010; 96: 3: 424–432.
32. Dabbs D. J., Landreneau R. J., Liu Y. et al. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 2: 403–406.
33. Raso M. G., Behrens C., Herynk M. H. et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 17: 5359–5368.
34. Huang Z., Zhu W., Szekeres G., Xia H. Development of new rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor: immunohistochemical assessment on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 1: 91–95.
35. Gomez-Fernandez C., Daneshbod Y., Nassiri M. et al. Immunohistochemically determined estrogen receptor phenotype remains stable in recurrent and metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 6: 879–882.

36. Umekita Y., Sagara Y., Yoshida H. Estrogen receptor mutations and changes in estrogen receptor and progesterone receptor protein expression in metastatic or recurrent breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 1: 27—32.
37. Allegra J. C., Barlock A., Huff K. K., Lippman M. E. Changes in multiple or sequential estrogen receptor determinations in breast cancer. *Cancer* 1980; 45: 4: 792—794.
38. Johnston S. R. D., Saccani-Jotti G., Smith I. E. et al. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 15: 3331—3338.
39. Macfarlane R., Seal M., Speers C. et al. Molecular alterations between the primary breast cancer and the subsequent locoregional/metastatic tumor. *Oncologist* 2012; 17: 2: 172—178.
40. Friboulet L., Olaussen K. A., Pignon J.-P. et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 12: 1101—1110.
41. Бозуш Т. А., Шатунова А. С., Дудко Е. А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестн Моск ун-та Сер 2. Химия* 2011; 52: 4: 305—312.
42. Бозуш Т. А., Тихомиров М. В., Дудко Е. А. и др. Количественное иммунофлуоресцентное определение экспрессии Pgr в солидных опухолях человека с использованием метода проточной цитофлуориметрии. *Вестн Моск ун-та* 2012; 53: 3: 207—215.
43. Jakobsen J. N., Santoni-Rugiu E., Ravn J., Sorensen J. B. Intratumour variation of biomarker expression by immunohistochemistry in resectable non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2013; 49: 11: 2494—2503.

Биологические свойства некоторых низкомолекулярных ароматических микробных метаболитов, ассоциированных с сепсисом

Н. В. БЕЛОБОРОДОВА, А. А. ОСИПОВ, А. Ю. БЕДОВА

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

Biological Properties of Some Sepsis-Associated Low Molecular Aromatic Microbial Metabolites

N. V. BELOBORODOVA, A. A. OSIPOV, A. YU. BEDOVA

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

В обзоре обобщены и проанализированы физико-химические и биологические свойства низкомолекулярных ароматических соединений, ассоциированных с сепсисом. Показано, что такие фенилкарбоновые кислоты (ФКК), как пара-гидроксифенилмолочная (п-ГФМК), фенилмолочная (ФМК), пара-гидроксифенилуксусная (п-ГФУК), фенилуксусная (ФУК), бензойная (БК) и фенилпропионовая (ФПК), обладают биорегуляторной активностью и способны влиять как на бактерии, так и на эукариотические клетки. В обзоре приведены данные о диагностической и патогенетической значимости ФКК, обобщены сведения о микростатических и микробицидных свойствах ФКК, биосинтезе ФКК клинически значимыми видами бактерий, описаны механизмы устойчивости микроорганизмов к ФКК, пути метаболизма ФКК прокариотами, мембранный транспорт и пути выведения ФКК из организма человека, а также приведены данные по применению ФКК в клинической практике. Авторы рассматривают ФКК микробного происхождения в качестве участников метаболических и сигнальных путей в процессе интеграции микробиома и человека. На основании данных литературы и результатов собственных исследований авторы обосновывают гипотезу о возможности создания новых лечебных стратегий, основанных на регуляции локального и системного баланса ароматических микробных метаболитов в организме человека.

Ключевые слова: низкомолекулярные фенольные соединения, ароматические микробные метаболиты, метаболический профиль, бензойная кислота, фенилкарбоновые кислоты, микробиом, монокарбоксилатные транспортёры, сепсис, клиническая микроэкология.

Physico-chemical and biological properties of sepsis-associated low molecular aromatic compounds are summarized and analysed in the review. Phenylcarbonic acids (PCAs), such as para-hydroxyphenyllactic acid (p-HPLA), phenyllactic acid (PLA), para-hydroxyphenylacetic (p-HPAA), phenylacetic acid (PAA), benzoic acid (BA), and phenylpropionic acid (PPA) are shown to have bioregulatory activity and be able to affect both bacteria and eukaryotic cells. In the review there are presented data on the diagnostic and pathogenetic value of PCAs, their bacteriostatic and bacteriocidal properties and biosynthesis by clinically significant bacterial species, as well as description of the mechanisms of microbial resistance to PCAs, the pathways of PCAs metabolism by prokaryotes, PCAs membrane transport and excretion pathways in humans, the data on the use of PCAs in clinical practice. The authors are of the opinion that PCAs of microbial origin share the metabolic and signal pathways in integration of the microbiome and man. On the basis of the literature data and personal studies the authors validated the hypothesis of possible development of new therapeutic strategies, grounded on regulation of the local and systemic balance of aromatic microbial metabolites in the human body.

Key words: low molecular phenol compounds, aromatic microbial metabolites, metabolic profile, benzoic acid, phenylcarbonic acids, microbiome, monocarboxylate transporters, sepsis, clinical microecology.

Введение

В процессе эволюции сформировалась устойчивая биологическая связь между микро- и макроорганизмами. В то же время в медицинских исследованиях её мало учитывают, традиционно изучение и описание биохимических и сигналь-

ных процессов, происходящих в организме человека и населяющей его микробиоте, проводится отдельно. По всей видимости, это связано с инертностью системы образования и репликации представления о разобщении биохимических регуляторных путей про- и эукариотов, не учитывающего явления коэволюции.

Мы придерживаемся точки зрения, что прогресс в медицине сегодня невозможен без познания законов жизнедеятельности микробиоты че-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 107031, Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2. НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН

ловека, её связи с метаболизмом человека, без открытия общих сигнальных путей, обеспечивающих участие микробных метаболитов в патогенезе как инфекционных, так и неинфекционных (онкологических, психических, эндокринных и др.) заболеваний, т. е. без развития нового медицинского научного направления — **клиническая микроэкология**.

Наиболее остро дефицит знаний по клинической микроэкологии ощущается в анестезиологии и реаниматологии. Сепсис остается одной из главных непосредственных причин смерти человека в реаниматологических отделениях, несмотря на наличие многокомпонентного мониторинга, использование мощных противомикробных препаратов и высокотехнологичных органозамещающих технологий [1-5]. Изучение ароматических микробных метаболитов и их роли в танатогенезе интенсивно ведется в Лаборатории метаболизма критических состояний (МКС) НИИ «Общей реаниматологии им. В. А. Неговского» РАМН [6].

Известно, что в сообществе микроорганизмов простые химические соединения выступают в роли биорегуляторов и сигнальных молекул, представляя собой наиболее архаичный механизм ауторегуляции и межклеточной коммуникации — «quorum sensing» [7]. В ходе эволюционного процесса низкомолекулярные соединения сохранили важную роль в организме человека: достаточно назвать некоторые гормоны (эндогенные катехоламины, гормоны щитовидной железы), нейротрансмиттеры (серотонин, γ -аминомасляная кислота), аутокринные регуляторы тканевого и митохондриального метаболизма (NO) и т. д.

Простые химические соединения могут выполнять важную связующую роль во взаимодействии метаболизма человека и бактерий. Появились экспериментальные работы по изучению адреналина и родственных ему катехоламинов в качестве веществ, ответственных за коммуникацию между бактериями и за их взаимодействие с клетками высших животных [8, 9]. Опубликованы результаты первых исследований профиля экзометаболитов живых микроорганизмов непосредственно в сыворотке крови здоровых и больных людей [6, 10, 11]. Работы по изучению микробных метаболитов в биосредах человека являются наиболее перспективными для изучения влияния микроэкологических нарушений, проявляющихся прежде всего дисбалансом экзометаболитов, на организм человека.

Фенилкарбоновые кислоты при сепсисе

Ранее было показано, что при сепсисе в сыворотке крови среди изученных различных классов

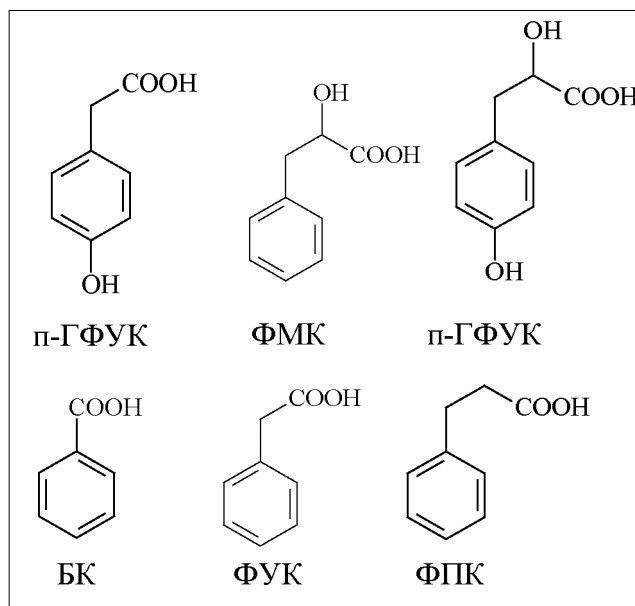


Рис. 1. Фенилкарбоновые кислоты, ассоциированные с сепсисом [12, 13].

низкомолекулярных веществ наибольшие изменения характерны для ароматических соединений — фенилкарбоновых кислот (ФКК), а именно пара-гидроксифенилмолочной (п-ГФМК), фенилмолочной (ФМК), пара-гидроксифенилуксусной (п-ГФУК), фенилуксусной (ФУК), бензойной (БК) и фенилпропионовой (ФПК) кислот (рис. 1) [12, 13]. Исследуемые вещества одного класса соединений в зависимости от наличия или отсутствия гидроксигруппы делятся на две подгруппы — гидроксированные и негидроксированные ФКК [14].

Показано, что тяжесть состояния больных коррелирует с суммарной концентрацией ФКК в сыворотке крови [10]. В прикладном плане предложено использовать количественное определение некоторых ФКК для диагностики сепсиса (патент на изобретение № 2423704 RU), однако чрезвычайно интересным является дальнейшее изучение и понимание механизмов участия этих экзометаболитов микробного происхождения в жизнедеятельности организма человека [14-17].

В качестве модели для теоретического анализа многообразия биологических свойств исследуемых ФКК в данном обзоре выбрана бензойная кислота (БК), сведения о которой наиболее полно представлены в литературе.

Бензойная кислота

Физико-химические свойства. Бензойная кислота (CAS No. 65-85-0; C_6H_5COOH , молекулярный вес 122.13) в чистом виде представляет собой бесцветные или белые кристаллы с температурой плавления 122°C и кипения 249°C. Плохо раство-

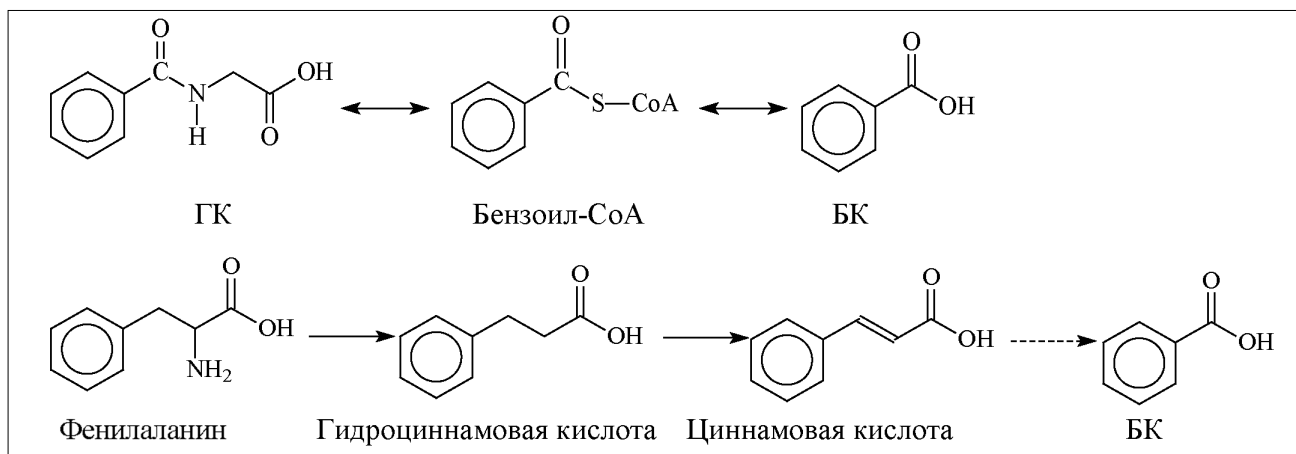


Рис. 2. Источники образования БК в кисломолочных продуктах [15, 19].

рима в воде (2,9 г растворяется в 1 л воды при 20°C). Для обнаружения бензойной кислоты и её солей в настоящее время используют спектрофотометрические методы, газовую и жидкостную хроматографию [18].

Природные источники БК и содержание её в продуктах питания. БК способны синтезировать бактерии, растения и грибы. Значительное содержание БК обнаружено в кисломолочных продуктах в результате её образования лактобактериями из глутаминовой кислоты (ГК) и биodeградации фенилаланина (рис. 2) [15, 18, 19].

В йогурте содержание БК 9 — 56 мг/кг, а в разных сортах сыра достигает 200 мг/кг и более [15]. Естественное содержание БК обнаружено в таких продуктах питания, как томаты, бобовые, злаковые, орехи, фрукты, мёд, грибы [18, 20, 21]. Высокие концентрации БК обнаружили во многих ягодах — до 0,05% их веса. Например, такие северные ягоды, как клюква и черника, содержат 300—1300 мг/кг БК [18], по другим данным — свыше 4500 мг/кг [22]. Своими антисептическими свойствами в традиционной медицине известна бензойная смола, получаемая из деревьев рода Стиракс (лат. *Styrax*). Известно, что образование БК резко усиливается в растениях в ответ на инфекцию [18, 23]. Из растительных низкомолекулярных ФКК лучше всего изучена салициловая кислота (орто-гидроксibenзойная кислота). Было показано, что она влияет на экспрессию генов митохондриальных белков, а её содержание изменяется однонаправленно с концентрацией БК [24]. У грибов БК образуется в результате биохимической деградации фенилаланина [25]. У животных первоначально БК обнаружили у травоядных, в том числе в молоке, где она находится в свободном и связанном состоянии в виде ГК [18, 19]. В ходе поиска информации о БК, включая анализ данных Human Metabolome Database (HMDB; www.hmdb.ca), не было найдено сведений о том, что в организме человека БК способна

образовываться в ходе биохимической деградации фенилаланина или синтезироваться *de novo* из алифатических соединений. Однако БК у человека может образовываться в результате окисления бензальдегида (содержится в продуктах питания), бензилового спирта (содержится в целом ряде лекарственных препаратов) [26, 27], продуктов окисления полифенолов [28, 29]. В работе F.Кноор [30] впервые показано, что при скормлировании животным фенилзамещённых жирных кислот в результате β -окисления боковых цепей ФКК с нечётным количеством атомов углерода (например, фенилпропионовой и фенилвалериановой кислот) образуется БК, а в результате β -окисления боковых цепей ФКК с чётным количеством атомов углерода (фенилмасляная, фенилкапроновая кислоты) образуется ФУК [30]. БК обнаружена в более высокой концентрации, по сравнению с другими ФКК, в фекалиях — 6,2 мг/л [31] и в сыворотке крови здоровых добровольцев — 0,079 мг/л [6, 10]. Присутствие БК в биологических средах человека в основном можно объяснить поступлением её с пищей и как результат образования микрофлорой желудочно-кишечного тракта, в том числе — в результате окисления полифенолов [28, 30]. На рис. 3 представлены пути образования некоторых ФКК в организме человека за счёт собственного и бактериального метаболизма фенилаланина и тирозина [14]. Однако возможна и обратная ситуация, когда бактерии используют ФКК, например п-ГФУК и п-ГФПК в качестве предшественников для синтеза фенилаланина, тирозина и триптофана [32].

Известно, что в результате тесного сосуществования в ходе эволюции высшие организмы утрачивают способность к образованию ряда метаболитов. Пример этого можно наблюдать на рис. 3 в отношении катаболизма ароматических аминокислот — образование циннамовой, гидроксициннамовой, фенилпропионовой и гидроксифе-

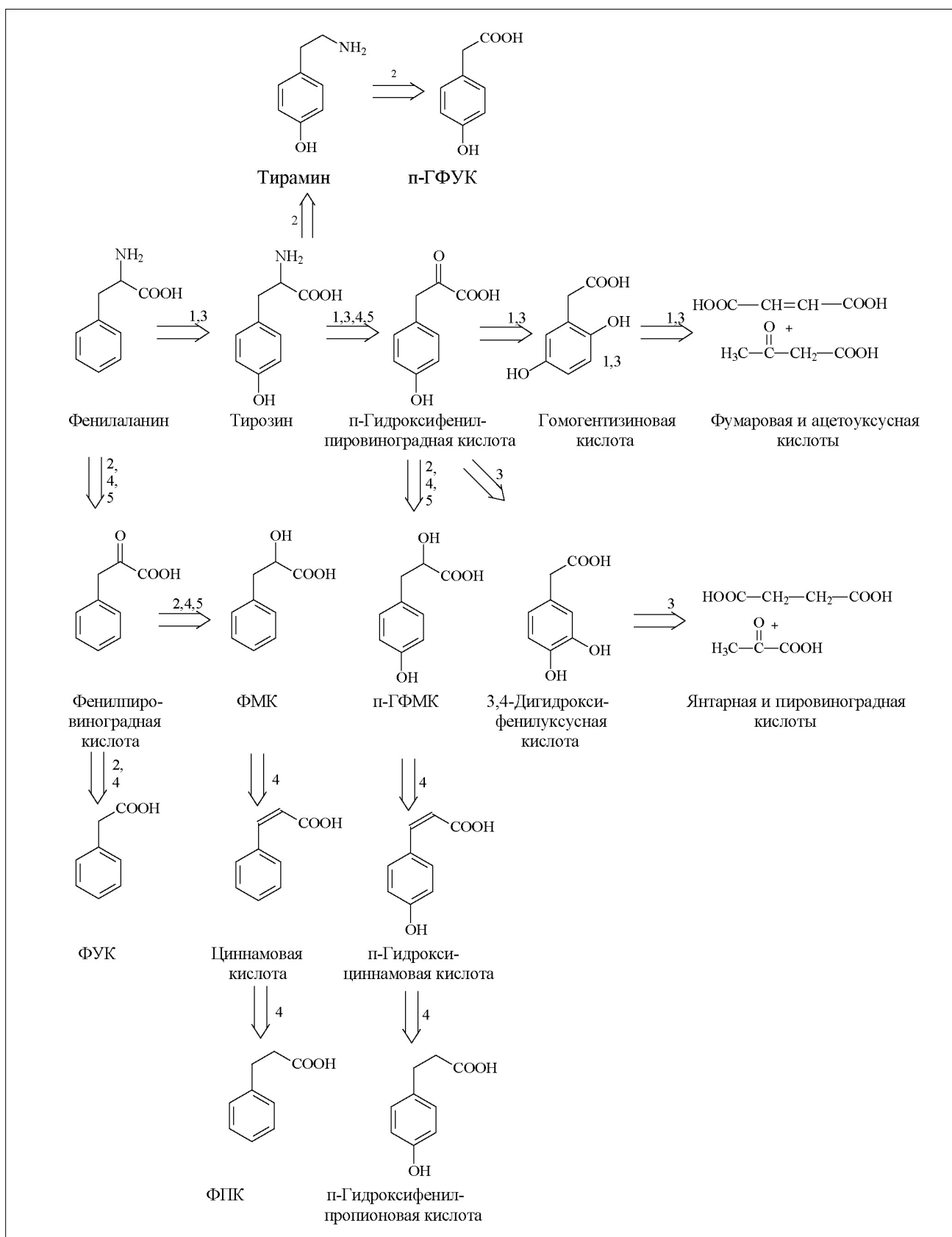


Рис. 3. Взаимосвязь эндогенного и микробного путей катаболизма фенилаланина и тирозина в организме человека [14].

1 — основной эндогенный путь; 2 — альтернативный эндогенный путь; 3 — аэробный микробный путь; 4 — анаэробный микробный путь; 5 — катаболизм факультативными анаэробами в аэробных условиях.

Таблица 1. Минимальная подавляющая концентрация БК для некоторых видов бактерий и грибов, мг/л

Микроорганизмы	рН	МПК, мг/л
<i>Escherichia coli</i> [108]	6,0	100—200
<i>Lactobacillus</i> spp. [15]	4,3—6,0	300—1800
<i>Klebsiella pneumoniae</i> [108]	6,0	100—200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [109]	5,0/7,0	250/1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [108]	6,0	200—500
<i>Staphylococcus aureus</i> [109]	5,0/7,0	500/1000
<i>Staphylococcus aureus</i> [108]	6,0	50—100
<i>Streptococcus</i> spp. [15]	5,2—5,6	200—400
<i>Candida albicans</i> [109]	5,0/7,0	130/>1000
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> [108]	4,8	4500
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> [109]	4,0	1200

нилпропионовой кислот происходит только анаэробным микробным путём.

Микростатические и микробицидные свойства. БК и её соли обладают природными антисептическими свойствами и широко используются в пищевой и косметической промышленности в качестве консервантов (Е210–Е213) [15, 18, 23]. Соли БК лучше растворяются в воде, чем сама БК, поэтому они находят более широкое применение. Например, растворимость бензоата натрия (CAS No. 532-32-1; C_6H_5COONa , молекулярный вес 144,1) в воде 550 г/л при 20°C [18]. Кальциевая и калиевая соли также используются, но их растворимость в воде ниже, чем у натриевой соли. В соответствии с СанПиН 2.3.2.1293-03 «Гигиенические требования по применению пищевых добавок» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 18 апреля 2003 г.) максимально допустимый уровень БК и её солей по отдельности или в любой комбинации в пересчёте на БК для разных продуктов питания колеблется от 150 до 2000 мг/кг (см. выше естественное содержание БК в продуктах питания). В табл. 1 приведена минимальная подавляющая концентрация (МПК) БК для некоторых видов бактерий и грибов.

В эксперименте на поросятах было показано, что БК оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие на микрофлору верхних отделов желудочно-кишечного тракта [33]. В микробиологических исследованиях по изучению влияния фенильных кислот на рост чистых культур клинически значимых штаммов микроорганизмов было установлено, что БК наряду с ФУК и ФПК в наибольшей степени подавляют размножение *E.coli*, при этом штамм *E.coli* ATCC 25992 (непатогенный штамм) более устойчив к влиянию БК и других ФКК, чем *E.coli* O157:H7 (CEST 5947, энтеропатогенный штамм). Установлено также, что ФКК с одной и двумя гидроксигруппами (3-гидрокси-, 4-гидрокси-, 3,4-дигидроксизамещённые ФКК) в ароматическом кольце в концентрации ≤ 1000 мг/л не влияли на размножение *E.coli* ATCC 25992 и в гораздо меньшей степени оказывали влияние на энтеропатогенный штамм. Напротив, по отношению к лактобактериям авторы отмечают иную

закономерность: 4-гидрокси- и 3-гидроксibenзойная кислоты сильнее подавляли размножение лактобактерий, чем сама БК. На другого представителя грамположительных бактерий БК и её гидроксипроизводные оказывали аналогичный эффект. По отношению к лактобактериям и *S.aureus* ФУК и ФПК остаются более сильными консервантами, чем их гидроксипроизводные. При изучении грам(-) бактерий авторы отмечают устойчивость штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 к БК и другим ФКК в концентрации 1000 мг/л. По отношению к грибам БК и ФПК лишь частично (на 16 и 29% соответственно) подавляют рост *Candida albicans* MY1055 в концентрации 1000 мг/л. Авторы работы предполагают, что чувствительность микроорганизмов к разным ФКК зависит от особенностей строения клеточной стенки [34]. Важно отметить, что все исследуемые авторами ФКК подавляли размножение микроорганизмов в концентрациях одного порядка, что согласно теории слабых органических кислот (см. ниже), говорит об их одинаковом механизме действия.

Существует мнение, что БК участвует в таком природном явлении, как аллелопатия — свойство одних организмов выделять химические соединения, которые тормозят или подавляют развитие других [35]. Данное предположение может быть справедливо и для других ФКК. Мы разделяем точку зрения о том, что ФКК в естественных условиях участвуют в регуляции состава и ростовой активности микробиоты человека [34].

В работе А. М. Jenner и соавт. [31] показано, что в фекальных промывных водах содержится значительное количество разнообразных ФКК, среди которых доминировали ФУК 479 мкМ, ФПК 166 мкМ, п-ГФПК 68 мкМ, 3,4-дигидроксициннамовая кислота 52 мкМ; БК 51 мкМ, 3-гидроксибензилуксусная кислота 46 мкМ; п-ГФУК 19 мкМ и 3,4-дигидроксибензилуксусная кислота 7 мкМ. Обращает на себя внимание, что при динамическом наблюдении за профилем ФКК в кишечнике у одного и того же добровольца концентрации БК были наиболее стабильны по сравнению с другими соединениями, колеблясь в пределах 23—25 мкМ изо дня в день [31].

Таблица 2. Значения МПК бензойной, молочной и уксусной кислот в отношении некоторых бактерий, мг/л [110]

Микроорганизм	Бензойная кислота	Уксусная кислота	Молочная кислота
<i>B.cereus</i> ATCC11778	296	2020	3480
<i>B.subtilis</i> ATCC6633	192	105	8320
<i>E.coli</i> ATCC25922	316	1550	3720
<i>L.fermentum</i> ATCC14931	2500	26300	25300
<i>L.plantarum</i> EH22G	2610	27500	30700

Таблица 3. Зависимость МПК, МБК и МФК бензойной кислоты и бензоата натрия (в мг/л) в отношении различных микроорганизмов от pH среды [109]

Компоненты	<i>S.aureus</i> NCTC 4163		<i>P.aeruginosa</i> NCTC 6749		<i>B.subtilis</i> NCTC 10400		<i>C.albicans</i> ATCC 10231	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
Бензойная кислота								
МПК	500	1000	250	1000	130	1000	130	>1000
МБК/ МФК	500	1000	250	>1000	130	1000	250	>1000
Бензоат натрия								
МПК	390	6250	1560	25000	190	6250	12500	25000
МБК/ МФК	>50000	>50000	6250	25000	390	50000	25000	>50000

Результаты наших исследований подтвердили способность чистых культур анаэробов микробиоты человека продуцировать ФКК [36], причём их состав совпадает с данными А. М. Jenner и соавт. [31]. Важно отметить, что количественное содержание некоторых ФКК в культуре анаэробов может достигать значений, известных как подавляющие размножение микробов. Так, уже в суточной культуре *Lactobacillus fermentum* содержалось ФПК 155,7 мг/л (1036,8 мкМ), п-ГФПК — 123,2 мг/л (795,6 мкМ) и т. д. К сожалению, в работе А. М. Jenner и соавт. не приведены данные по содержанию в фекальных промывных водах п-ГФМК и ФМК. По данным литературы и нашим собственным данным, ФМК и п-ГФМК продуцируются при культивировании *in vitro* анаэробных грамположительных бактерий [36–39]. Например, в суточной культуре *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus fermentum* основными ФКК были: ФМК — 64,9 мг/л (390 мкМ) и 35,4 мг/л (213 мкМ) соответственно и п-ГФМК — 39,4 мг/л (216,28 мкМ) и 13,7 мг/л (72,3 мкМ) соответственно [36]. В работе F. Valerio [39] также обнаружена способность лактобактерий продуцировать ФМК и п-ГФМК, в частности в 72-часовой культуре 5 штаммов *Lactobacillus plantarum* содержалось ФМК 310 ± 19 мкМ и ГФМК 260 ± 13 мкМ, в то время как использованные в их работе штаммы *L.fermentum* продуцировали незначительное количество ФМК и неопределённо малое количество п-ГФМК [39]. С. L. Gerez и соавт. [37] приводят данные, что супернатант 24-часовой культуры лактобактерий содержал ФМК 200–3500 мкМ [37]. Доказано, что ФМК и п-ГФМК так же, как и другие анализируемые нами ФКК, обладают свойствами консерванта и способны ингибировать размножение бактерий и грибов в концентрации от 500 мг/л, при этом более чувствительными

к ФМК и п-ГФМК оказываются плесневые грибы и грамположительные бактерии [38, 40, 41].

Теория слабых органических кислот применительно к ФКК. В ранних исследованиях БК было установлено, что её противомикробные свойства максимально проявляются в кислой среде, а в среде, близкой к нейтральной, эти свойства заметно слабее [42, 43]. Наряду с БК в качестве консервантов пищевых продуктов широко используют молочную (Е270), уксусную (Е260), пропионовую (Е280), сорбиновую (Е200) кислоты. Все они являются слабыми кислотами, в частности значение рКа БК составляет 4,21, т. е. при pH 7 доля недиссоциированных молекул БК составляет 0,144%, а при pH 3 уже 93,5% [15, 42]. В табл. 2 приведены МПК для БК, молочной и уксусной кислот в отношении некоторых бактерий.

Для объяснения антимикробных свойств БК и других низкомолекулярных органических кислот была предложена «теория слабых органических кислот» [23]. Согласно этой теории, при низких значениях pH в растворе возрастает содержание недиссоциированных молекул БК, которые за счёт своих липофильных свойств способны проникать через плазматическую мембрану клеток. Значение pH внутри клеток близко к нейтральному. После проникновения внутрь клетки молекулы БК диссоциируют с высвобождением H^+ , что приводит к закислению внутриклеточной среды и нарушению функций клетки.

Тот же механизм проникновения рассматривают для других слабых органических кислот [17, 44]. В табл. 3 приведены данные о зависимости минимальной подавляющей (МПК), минимальной бактерицидной (МБК) и минимальной фунгицидной (МФК) концентрации БК и бензоата натрия от pH среды.

Влияние БК на клеточный метаболизм. В научных целях для исследования механизмов влияния БК на эукариотическую клетку чаще всего используют пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), так как данный вид обладает природной повышенной устойчивостью к БК и не способен её утилизировать в качестве источника углерода [45]. Добавление БК к культуре *Saccharomyces cerevisiae* приводит к снижению скорости образования клеточной биомассы на фоне увеличенного потребления кислорода и глюкозы. Цитологическое исследование показало, что пропорционально росту потребления кислорода под влиянием БК происходит увеличение внутриклеточного объёма, занимаемого митохондриями. При достижении порогового значения концентрации БК потребление кислорода снижается и ускоряется процесс ферментативного образования этанола [46]. Возрастные потребление кислорода и микростатический эффект БК объясняют увеличением расхода АТФ на удаление из клетки бензоата и протонов с целью поддержания нормального значения внутриклеточного рН [47, 48]. БК является осмотически активным веществом и её накопление внутри клетки, помимо закисления внутриклеточной среды, может вызвать набухание клетки. При быстром возрастании концентрации БК в питательной среде после кратковременного пика потребления кислорода развивается длительная депрессия потребления кислорода, а также снижение потребления глюкозы, что связывают с ингибированием ферментов цикла Кребса и гликолиза, в частности фосфофруктокиназы [15, 46, 49, 50]. Известно также, что БК вызывает деполяризацию клеточной мембраны и влияет на мембранный транспорт [35].

Ранее нами на культуре митохондрий крыс было показано, что БК в концентрации 0,1 мМ значительно снижает мембранный потенциал, снижает кальциевую ёмкость митохондрий, ингибирует процесс дыхания (I комплекс дыхательной цепи) и подавляет окисление пирувата, предположительно из-за ингибирования пируватдегидрогеназы. Эти эффекты бензоата, расцененные нами как токсические, в эксперименте снимались менадином и дитиотреитолом, что указывает на окисление тиоловых групп [51, 36]. Также нами было обнаружено, что БК и ряд других ФКК подавляют выработку активных форм кислорода (АФК) в нейтрофилах, что, по всей видимости, проявляется в нарушении фагоцитарной активности [36]. Эти данные согласуются с результатами других работ [52, 53].

Из литературы известно также, что бензоат натрия в концентрации 0,5–2 мМ значительно подавляет выработку клетками микроглии под влиянием липополисахарида (ЛПС) ряда цитокинов (TNF- α , IL-1 β), NF- κ B и индуцибельной NO синтазы (iNOS). При этом для реализации эф-

фектов бензоата натрия важное значение имела длительность предшествующей инкубации микроглиальных клеток с бензоатом натрия — то есть время контакта до внесения в культуральную среду ЛПС [54]. В работе из Испании исследователи выявили, что два других метаболита бактерий — 3,4-дигидроксифенилпропионовая и 3,4-дигидроксифенилуксусная кислоты также в значительной степени подавляют продукцию провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1b и IL-6) в мононуклеарных клетках [55].

Показано, что добавление бензоата натрия к культуре клеток микроглии подавляет экспрессию поверхностных CD-маркёров и главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II). Аналогичные данные были получены при изучении влияния бензоата натрия на астроциты человека [54].

В эксперименте на гомогенизатах печени крыс было установлено, что бензоат натрия в концентрации 0,5–2 мМ существенно подавляет окисление жирных кислот, а при инъекции бензоата натрия крысам в дозировке 5–10 ммоль/кг (1220–2440 мг/кг) в образцах печени животных отмечалось значимое снижение концентрации АТФ, CoA, ацетил-CoA и повышение аммиака [56].

Внутриклеточное значения рН и мембранный транспорт БК. Поддержание постоянства внутриклеточного значения рН в изменяющихся условиях внешней среды является одной из важнейших функций клетки, необходимой для её выживания.

В работе J. Lin и соавт. было показано, что одним из механизмов устойчивости к БК является механизм глутаматиндуцированной резистентности бактерий к кислой среде, в то время как аргининзависимый механизм устойчивости *E.coli* к закислению среды оказывается менее эффективным [57]. Данные механизмы изучены недостаточно, но в эксперименте с *E.coli* было обнаружено, что добавление в питательную среду БК вызывает усиление экспрессии более 30 белков [58].

Удаление протонов из внутриклеточного пространства у *Saccharomyces cerevisiae* происходит посредством мембранной H⁺-АТФазы (Pma1). В случае добавления в питательную среду БК происходит интенсификация этого процесса [47]. *Saccharomyces cerevisiae*, в отличие от *Zygosaccharomyces bailii*, не способны метаболизировать анионы БК, поэтому они удаляются из клетки посредством мембранных переносчиков. Индукцию образования транспортёра Pdr12p считают одним из ключевых механизмов адаптации *Saccharomyces cerevisiae* к БК, при этом удаление бензоата из клетки осуществляется путём активного транспорта [48].

Мембранный переносчик Pdr12p относится к суперсемейству ABC-транспортёров (ATP-bind-

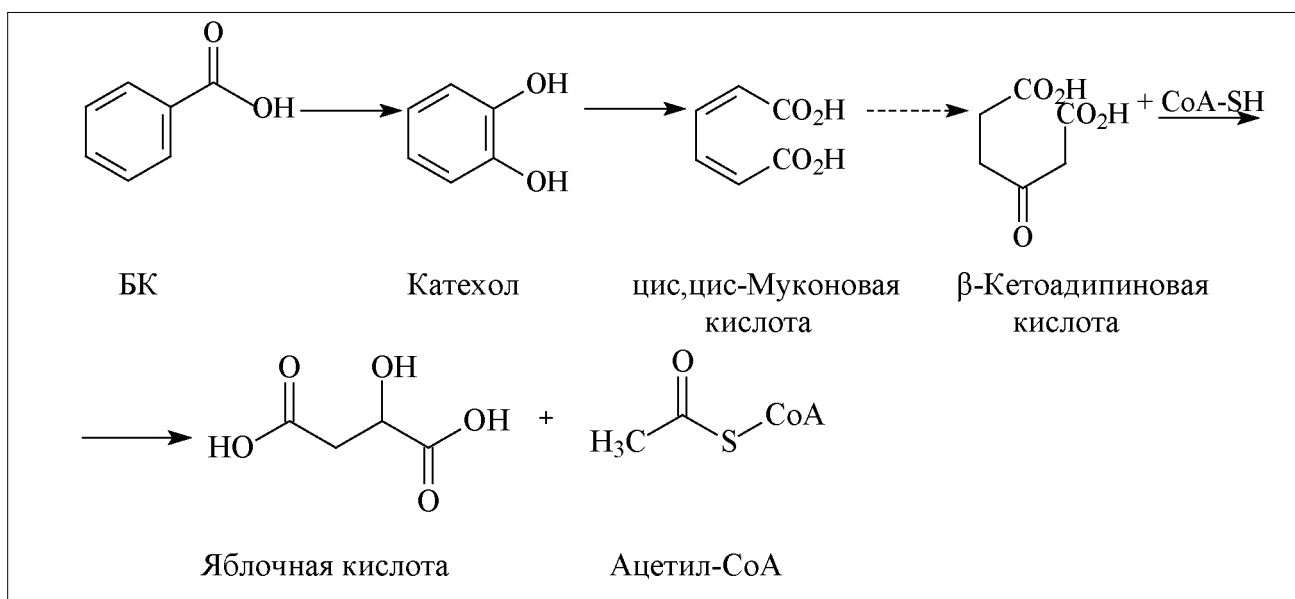


Рис. 4. Аэробный, β -кетoadипиновый путь расщепления БК бактериями [76].

ing cassette) и, помимо транспорта бензоата, участвует в переносе других анионов слабых органических кислот, включая анионы п-ГФУК и ФУК [17]. ABC-транспортёры были обнаружены как у прокариотов, так и у эукариотов, включая человека [59, 60]. У микроорганизмов ABC-транспортёры играют ключевую роль в развитии устойчивости к противомикробным препаратам, а у человека — к противоопухолевым препаратам [61].

У млекопитающих и человека в транспорте аниона БК принимают участие белки-транспортёры MFS-суперсемейства (major facilitator superfamily) — протонзависимые монокарбоксилатные транспортёры (MCTs), а также натрийзависимые монокарбоксилатные транспортёры (SMCTs). Транспорт бензоата этими транспортёрами осуществляется путём облегчённой диффузии по градиенту протонов водорода (анион-водородный симпорт) и натрия, при этом зависит от градиента переносимого аниона [62–66]. Семейство монокарбоксилатных транспортёров (MCTs, SLC16As) представлено не менее чем 14 мембранными белками, включая транспортёры для низкомолекулярных монокарбоновых кислот (MCT1–MCT4), гормонов щитовидной железы (MCT8, SLC16A10) и ароматических аминокислот (MCT10, SLC16A2). MCTs обеспечивают трансмембранный транспорт таких важных с точки зрения основного метаболизма монокарбоксилатов, как лактат, пируват, ацетоацетат. SMCTs, используя градиент концентраций натрия, транспортируют лактат, пируват и кетоновые тела из внеклеточной среды, например в слизистой кишечника, почечном эпителии, мозге [65, 67, 68]. MCT1 является универсальным транспортёром для большинства тканей и органов, включая ге-

матозэнцефалический барьер, в то время как другие MCTs обладают органоспецифичностью. MCTs участвуют в поддержании внутриклеточного pH путём удаления из цитозоля органических кислот, образующихся в ходе гликолиза и других метаболических процессов. Белые скелетные мышцы, эритроциты, опухолевые клетки особенно зависимы от MCTs, так как в них процесс гликолиза протекает особенно интенсивно с выделением органических кислот. [69]. Печень и почки, напротив, способны утилизировать лактат для глюконеогенеза, а сердечная мышца и красные скелетные мышцы используют лактат в процессе дыхания [66, 70].

Таким образом, MCTs, в зависимости от ткани и её функциональной активности, способны удалять монокарбоксилатные органические кислоты из клетки, либо транспортировать их внутрь клетки. В целом, специфический транспорт моно- и C4-дикарбоксилатов играет ключевую роль в энергетическом обмене эукариотической клетки, обеспечивая взаимосвязь внутриклеточных и системных метаболических процессов в целостном организме [71]. На сегодняшний день показано, что ароматические кислоты, в частности БК и фенилпировиноградная кислота, способны ингибировать работу MCTs, что может отражаться на способности клетки поддерживать оптимальный уровень внутриклеточного pH в случае повышения внутриклеточной концентрации ФКК, как было описано выше, изменять работу её ферментных путей [64, 69, 72–75].

Метаболизм БК микроорганизмами. Аэробный путь расщепления БК у бактерий происходит преимущественно по β -кетoadипиновому пути с участием диоксигеназы, при этом основным ин-

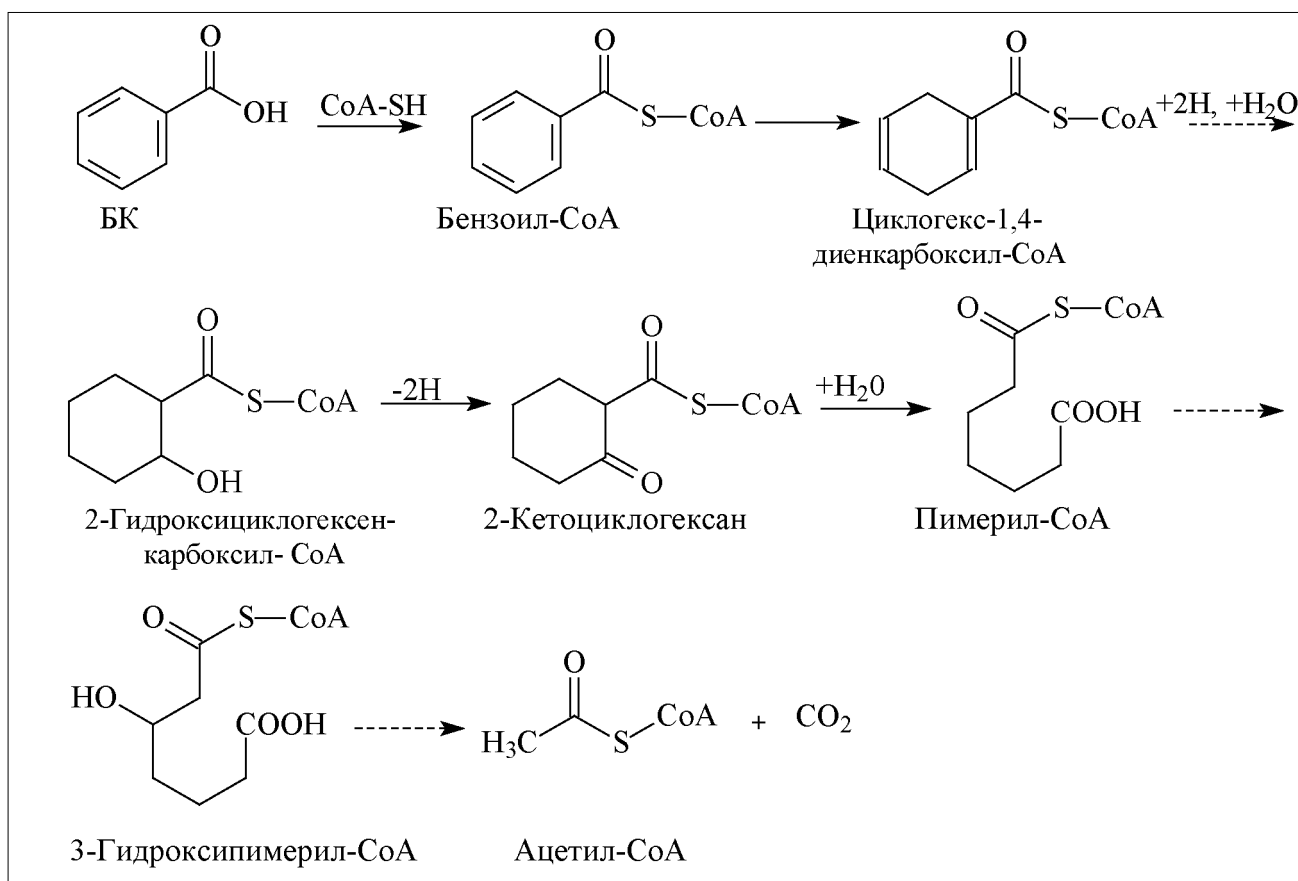


Рис. 5. Анаэробный путь расщепления БК бактериями [76].

термедиатом является катехол (пирокатехин), который подвергается расщеплению между двумя гидроксированными атомами углерода (орто-расщепление). В качестве субстрата для орто-расщепления бензольного кольца может выступать также протокатеховая кислота с образованием в качестве промежуточного продукта β -карбокси-цис,цис-муконовой кислоты (рис. 4) [76].

Этот путь метаболизма БК характерен как для бактерий, так и для грибов [6, 77–79]. В более редких случаях катехол и протокатеховая кислота подвергаются расщеплению между гидроксированным и негидроксированным атомом углерода (мета-расщепление). В этом случае конечными продуктами биodeградации являются пируват и ацетальдегид [76].

Также описан аэробный путь биodeградации БК с участием монооксигеназ. Промежуточными продуктами в этом случае могут являться 4-гидроксибензойная, 3,4-дигидроксибензойная (протокатеховая), 2,5-дигидроксибензойная (гентибиновая) кислоты [45, 76, 80].

Основной интермедиат аэробного расщепления БК — пирокатехин обладает свойствами эндогенных катехоламинов, вызывая повышение артериального давления и оказывая бронходилатирующий эффект [81–84].

Третьим известным путём аэробной деградации БК является образование на первом этапе бензоил-CoA с последующим участием монооксигеназы [85]. Конечными продуктами третьего пути являются ацетил-CoA и сукцинил-CoA.

В случае анаэробных условий кислород не может быть использован для активации ароматического кольца. Анаэробный путь бактериального метаболизма БК начинается с образования бензоил-CoA, с последующими стадиями последовательной редукции двойных связей в кольце и его расщеплением. Конечными продуктами анаэробной деградации БК являются ацетил-CoA и углекислый газ.

Ферментирующие бактерии не получают энергетической выгоды от расщепления ароматического кольца. Нитратредуцирующие бактерии и тем более аэробы, напротив, способны утилизировать ацетил-CoA в цикле трикарбоновых кислот с образованием значительного количества АТФ, тем самым компенсируя с избытком энергозатраты на метаболизм БК. Через образование бензоил-CoA также осуществляется анаэробный метаболизм ФУК, фенола, *p*-крезола, анилина, прекурсоров БК, *p*-ГБК (рис. 5) [86–88].

В своей работе мы отметили, что грамположительные и грамотрицательные бактерии, ассоции-

ированные с сепсисом, способны продуцировать ФКК (преимущественно ФМК и п-ГФМК, а *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* — п-ГФУК), однако их потенциал синтеза ФКК в чистых культурах, по нашим данным, значительно ниже, чем у строгих анаэробов. Как было сказано выше, анаэробные бактерии не получают энергетической выгоды от расщепления ароматического кольца, этим фактом можно объяснить, почему анаэробы в большей степени, нежели факультативные анаэробы, накапливают в среде ФКК и соответственно должны были выработать механизмы устойчивости к ФКК (биохимические или симбиотические).

Выведение БК из организма человека. Из всех ФКК — производных фенилаланина человек способен метаболизировать с раскрытием ароматического кольца только пара-гидроксифенилпировиноградную кислоту через её метаболит — гомогентизиновую кислоту. В случае БК в организме животных и человека, в митохондриях печени и почек, она подвергается конъюгации с глицином под влиянием глицинтрансферазы и в виде гиппуровой кислоты (ГК) выводится с мочой [89–91].

Дополнительным путём выведения БК из организма человека (менее 20% БК) служит её конъюгация с глюкуроновой кислотой [92]. В оригинальном исследовании на гомогенизатах тканей человека было установлено, что скорость конъюгации БК и глицина в печени в среднем составила $254 \pm 90,5$ нмоль/мин на 1 г печени (экстремальные значения составили 94,4 и 564 нмоль/мин на 1 г печени). В гомогенизатах коркового вещества почки скорость конъюгации БК и глицина в среднем была выше, чем в печени, и составила $321 \pm 99,3$ нмоль/мин на 1 г ткани (экстремальные значения составили 63,3 и 542 нмоль/мин на 1 г коркового вещества почки) [93]. Для ФУК и п-ГФУК известно, что в организме человека образуются их конъюгаты с глицином и глутамином, для ФПК — с глицином. Однако в международных метаболомных базах не было найдено сведений об образовании конъюгатов п-ГФМК и ФМК.

У здорового человека в течение 6 часов происходит выведение с мочой не менее 70% образовавшейся ГК после разового приёма тестовой дозы БК внутрь [82]. На этом факте основан клинико-лабораторный тест — проба Квика, по результатам которого судят о тяжести печеночной недостаточности.

Концентрация ГК значительно возрастает в крови у больных с почечной недостаточностью. Установлено, что ГК обладает токсическим эффектом на организм человека и её относят к умеренным токсинам [94, 95]. Интересен такой факт, что в роде *Campylobacter* один из видов *C. jejuni*

был идентифицирован как возбудитель гастроэнтерита у человека. При этом оказалось, что, в отличие от непатогенного вида *C. coli*, патогенный вид способен разлагать ГК на БК и глицин [96].

Дозозависимое действие БК на человека и животных. LD₅₀ БК для кроликов при приёме внутрь составляет 3040 мг/кг, для мышей — 1940–2263 мг/кг. LD₅₀ БК для кошек более чем в 2 раза меньше, что связано с их низкой способностью к глюкуронированию. LD₅₀ бензоата натрия для крыс при приёме внутрь, по разным данным, составляет 2100–4070 мг/кг [18]. Для БК при многократных и длительных приёмах внутрь NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) составляет 800 мг/кг/сутки. Как показано в эксперименте на животных, свыше этого уровня растёт смертность, снижается масса тела и обнаруживаются токсические эффекты на почки и печень [92]. Однако известно, что толерантность к токсическому эффекту бензоата возрастает при добавлении в диету животным глицина [97].

У людей скорость биотрансформации БК и её солей составляет, по разным данным, 17–29 мг/кг/ч и не зависит от дозы БК [18]. Пик концентрации БК в плазме после приёма внутрь достигается через 1–2 ч [18]. При приёме внутрь БК в дозе 1000 мг/кг в сутки развивается метаболический ацидоз с электролитными нарушениями в виде гипокалиемии и гипокальциемии. В исследовании на добровольцах при ступенчатом увеличении дозировки БК до 2500 мг/сут испытуемые предъявляли жалобы на тошноту, головную боль, слабость, изжогу. Токсические эффекты БК на организм регистрируются при её концентрации в сыворотке более 800 мг/л (6,55 mM) [82].

По нашим собственным данным, в группе больных с сепсисом медиана суммы концентраций клинически значимых ФКК в сыворотке крови составляет не менее 25,7 мкМ (интерквартильные размахи 25 и 75% соответственно составили 13 мкМ и 59,2 мкМ) [10]. По данным литературы, при фенилкетонурии уровень ФМК в плазме крови может составлять более 50 мкМ [98].

Бензоат натрия используют для лечения гипераммониемии у людей с нарушенным циклом образования мочевины. В этом случае бензоат натрия вводят медленно внутривенно или дают внутрь в дозировке 250–500 мг/кг в сутки [99]. Из побочных эффектов наиболее часто регистрируют рвоту, особенно при внутривенном введении [18]. Установлено, что бензоат вытесняет билирубин из его связей с альбумином, что приводит к повышению концентрации и токсичности свободного билирубина в сыворотке крови у больных, которые получают лечение бензоатом натрия [100, 101]. У пациентов, получающих терапию бензоатом натрия, отмечено повышение концентрации триптофана в крови и как следст-

вие серотонина в головном мозге, чем объясняют подавление аппетита у данной категории больных. На примере взаимодействия бензоата натрия и трипсина было показано, что бензоат способен изменять форму белка, влияя на его β -складчатые структуры [102]. Существуют работы, указывающие, что у части больных шизофренией нарушен синтез ГК [103]. Также описаны 3 случая передозировки бензоата натрия и фенилacetата натрия. У всех пострадавших было нарушено сознание и развился тяжёлый метаболический ацидоз, двое пострадавших погибли [104].

БК и бензоат натрия американской организацией FDA включены в список относительно безопасных пищевых добавок (GRAS). Комитет JECFA (THE JOINT FAO/WHO COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES) считает приемлемым ежедневное поступление (ADI) БК и бензоата натрия в организм человека в количестве 0—5 мг/кг массы тела [105].

Таким образом, низкомолекулярные ароматические кислоты, такие как бензойная и ряд других фенилкарбоновых кислот, известные как промежуточные и конечные продукты бактериального метаболизма, обладают биорегуляторной активностью не только в отношении микроорганизмов, но и в отношении эукариотических клеток организма человека.

Ранее было сказано, что тяжесть состояния больных прямо коррелирует с интегральной концентрацией ароматических микробных метаболитов (АММ) в сыворотке крови [10, 11]. Согласно универсальной теории слабых органических кислот ФКК обладают общим механизмом действия: они вызывают закисление внутриклеточной среды и подавляют выработку АТФ и/или истощают её запасы в клетке, т. е. могут участвовать в развитии цитопатической гипоксии при сепсисе [106, 107]. Чувствительность организмов к ФКК, что следует из приведённых выше фактов, широко варьирует, но существует общая тенденция усиления токсичности этих соединений при закислении среды (ацидозе).

Заключение

Обобщая данные литературы и результаты собственных исследований, нами сформулированы и предложены для изучения несколько положений, которые могут служить дальнейшим развитием гипотезы [6] об интеграции метаболизма и роли микробных экзометаболитов в организме человека:

ЛИТЕРАТУРА

1. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S.M. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med 2013; 41: 2: 580—637.
2. Angus D.C., Linde-Zwirbl W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29: 7: 1303—1310.

1. В периепителиальном слое естественных микробиоценозов человека, а также на границе очага инфекции в тканях (перикапиллярно, периепителиально) уровни ФКК могут достигать значений, достаточных для локального и/или системного проявления их биологических эффектов, что может проявляться не только в изменении состава и метаболической активности микробиоты, но и влиять на реактивность иммунокомпетентных клеток, тканеспецифическую функцию органов и др.

2. При ряде клинических состояний (сепсис, шок, гипоксия, тяжёлая почечная/печеночная недостаточность, митохондриальная дисфункция и др.) распределение прекурсоров ФКК, самих ФКК, продуктов их химического превращения и конъюгации в организме человека может значительно отличаться от здорового человека. Все это может существенно влиять на степень проявления биологической активности метаболитов, в том числе — за счёт изменения их внутриклеточных концентраций.

3. Накопление новых знаний о ФКК в перспективе может способствовать разработке новых лечебных стратегий, например: управление составом и метаболической активностью микробиоценозов естественных и патологических (очаг инфекции в тканях) биотопов тела человека; управление метаболизмом человека; управление реактивностью иммунокомпетентных клеток путём коррекции метаболического профиля и др. Уже сегодня такие поисковые работы ведутся нами в клинике, в частности — при сепсисе, септическом шоке, операциях с искусственным кровообращением, при тяжёлой сочетанной травме и др.

Необходимы более глубокие знания о естественных законах регуляции в микробиоценозах, о сигнальных механизмах, обеспечивающих интеграцию метаболизма человека и его микробиома. Главной идеей данного обзора является намерение привлечь внимание специалистов к участию в разработке принципиально новых лечебных стратегий, основанных на регуляции локального и системного баланса ароматических микробных метаболитов в организме человека, направленных на улучшение результатов лечения заболеваний и состояний человека, прежде всего — сепсиса.

Статья подготовлена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-01758 А 2013—2014 гг.

3. Хубутия М.Ш., Шабанов А.К., Черненко Т.В., Годков М.А., Дорфман А.Г. Инфекционные лёгочные осложнения в реанимации и интенсивной терапии у пострадавших с сочетанной травмой. Общ. реаниматология 2011; 7: 4: 24—27.
4. Мороз В.В., Лукач В.Н., Шифман Е.М., Долгих В.Т., Яковлева И.И. Сепсис: клиничко-патолофизиологические аспекты интенсивной терапии: руководство для врачей. Петрозаводск: ИнтелТек; 2004.
5. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2011; 13: 4: 294—303.

6. Белобородова Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях. *Общая реаниматол* 2012; 8: 4: 42—54.
7. Rutherford S.T., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: 11: a012427.
8. Шпаков. А.О. Сигнальные пути бактерий непептидной природы QS-типа. *Микробиология* 2009; 78: 2: 163—175.
9. Lyte M., Vulchanova L., Brown D.R. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 1: 23—32.
10. Белобородова Н.В., Оленин А.Ю., Ходакова А.С., Черневская Е.А., Хабиб О.Н. Происхождение и клиническое значение низкомолекулярных фенольных метаболитов в сыворотке крови человека. *Анестезиол реаниматол* 2012; 5: 65—72.
11. Белобородова Н.В., Возиян А.Ю., Осипов А.А. Лабораторная диагностика бактериальной интоксикации методом газохроматографического анализа крови. *Клин лаб диагн* 2012; 9: 79.
12. Белобородова Н.В., Архипова А.С., Белобородов Д.М., Бойко Н.Б., Мелько А.И., Оленин А.Ю. Хромато-масс-спектрометрическое определение низкомолекулярных ароматических соединений микробного происхождения в сыворотке крови больных сепсисом. *Клин лаб диагн* 2006; 2: 3—6.
13. Khodakova A.S., Beloborodova N.V. Microbial metabolites in the blood of patients with sepsis. *Critical Care* 2007; 11: Suppl 4: 5.
14. Белобородова Н.В., Ходакова А.С., Байрамов И.Т., Оленин А.Ю. Микробный путь образования фенилкарбоновых кислот в организме человека. *Биохимия* 2009; 74: 12: 1657—1663.
15. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A. L. Editors. Antimicrobials in food. 3rd ed. London: Taylor & Francis Group; 2005.
16. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 9: 4084—4090.
17. Hazelwood L.A., Tai S.L., Boer V.M., de Winde J.H., Pronk J.T., Daran J.M. A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 6: 937—945.
18. World Health Organization. Concise International Chemical Assessment Document 26. Benzoic acid and sodium benzoate. Geneva: 2000.
19. Sieber R., Bittkofer U., Bosse J.O. Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *Int Dairy J* 1995; 5: 227—246.
20. Kaškonienė V., Maruška A., Kornysheva O., Charczun N., Ligor M., Buszewski B. Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Chemine Technologija*. 2009; 3: 52: 74—80.
21. Tjakko S., Maria Angela L. de A. Amazonas., Giller V. Characterisation of flavour and taste compounds in *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinem., the cultivated almond mushroom. *Australasian Mycologist* 2004; 22: 3: 116—122.
22. Pappas E., Schaich K. M. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; 49: 9: 741—781.
23. Russel N.J., Could G.W. ed. Food Preservatives. 2nd ed. NY: Springer; 2003.
24. Белозерова Н.С. Влияние цитокинов и салициловой кислоты на экспрессию генов митохондриальных белков. М.: ФГБУ «ИФР» РАН; 1—150.
25. Moore K., Rao P.V., Towers G.H. Degradation of phenylalanine and tyrosine by *Sporobolomyces roseus*. *Biochem J* 1968; 106: 2: 507—514.
26. Andersen A. Final report on the safety assessment of benzaldehyde. *Int J Toxicol* 2006; 25: Suppl 1: 11—27.
27. European commission health & consumer protection directorate-general. Opinion of the scientific committee on food on benzyl alcohol. Brussel: 2002.
28. Lord S.R., Bralley J.A. Clinical applications of urinary organic acids. Part 2. Dysbiosis Markers. *Altern Med Rev* 2008; 13: 4: 292—306.
29. Grün C.H., van Dorsten F.A., Jacobs D.M., Le Belleguic M., van Velzen E.J., Bingham M.O. et al. GC-MS methods for metabolic profiling of microbial fermentation products of dietary polyphenols in human and *in vitro* intervention studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 871: 2: 212—219.
30. Knoop F. Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. *Beitr Chem Physiol Pathol* 1904; 6: 150—162.
31. Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 6: 763—772.
32. Khan R.I., Onodera R., Amin M.R., Mohammed N. Aromatic amino acid biosynthesis and production of related compounds from p-hydroxyphenylpyruvic acid by rumen bacteria, protozoa and their mixture. *Amino Acids* 2002; 22: 2: 167—177.
33. Knarreborg A., Miquel N., Granli T., Jensen B.B. Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Anim Feed Sci Technol* 2002; 99: 131—140.
34. Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martín-Alvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res Microbiol* 2010; 161: 5: 372—382.
35. Glass A.D. Influence of phenolic acids on ion uptake: IV. Depolarization of membrane potentials. *Plant Physiol* 1974; 54: 6: 855—858.
36. Beloborodova N., Bairamov I., Olenin A., Shubina V., Teplova V., Fedotcheva N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *J Biomed Sci* 2012; 19: 89.
37. Gerez C.L., Torres M.J., Font de Valdez G., Rollán G. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control* 2012; 64: 231—237.
38. Suskovic J., Kos B., Beganovic J., Pavunc A.L., Habjanic K., Matosic S. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol* 2010; 48: 3: 296—307.
39. Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M., Visconti A. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 233: 2: 289—295.
40. Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl Environ Microbiol* 2000; 69: 1: 634—640.
41. Dieuleveux V., Lemarinier S., Guéguen M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *Int J Food Microbiol* 1998; 40: 3: 177—183.
42. Gabel L.F. The relative action of preservatives in pharmaceutical preparations. *J Am Pharm Assoc* 1921; 10: 10: 767—768.
43. Cruess W.V., Richert P.H. Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to microorganisms. *J Bacteriol* 1929; 17: 5: 363—371.
44. Warth A.D. Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of General Microbiology* 1989; 135: 5: 1383—1390.
45. Mollapour M., Piper P.W. The ZbYME2 gene from the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* confers not only YME2 functions in *Saccharomyces cerevisiae*, but also the capacity for catabolism of sorbate and benzoate, two major weak organic acid preservatives. *Mol Microbiol* 2001; 42: 4: 919—930.
46. Verduyn C., Postma E., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 1992; 8: 7: 501—517.
47. Holyoak C.D., Stratford M., McMullin Z., Cole M.B., Crimmins K., Brown A.J. et al. Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak acid preservative sorbic acid. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 9: 3158—3164.
48. Holyoak C.D., Bracey D., Piper P.W., Kuchler K., Coote P.J. The *Saccharomyces cerevisiae* weak acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *J Bacteriol* 1999; 181: 15: 4644—4652.
49. Krebs H.A., Wiggins D., Stubbs M., Sols A., Bedoya A. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J* 1983; 214: 3: 657—663.
50. Pearce A.K., Booth I.R., Brown A.J. Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 2001; 147: Pt 2: 403—410.
51. Федотчева Н.И., Теплова В.В., Белобородова Н.В. Участие фенольных кислот микробного происхождения в дисфункции митохондрий при сепсисе. *Биол мембран* 2010; 27: 1: 60—66.

52. Merfort I., Heilmann J., Weiss M., Pietta P., Gardana C. Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs. *Planta Med* 1996; 62: 4: 289–292.
53. Limasset B., Ojasoo T., le Doucen C., Doré J.C. Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. *Planta Med* 1999; 65: 1: 23–29.
54. Brahmachari S., Jana A., Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, reduces microglial and astroglial inflammatory responses. *J Immunol* 2009; 183: 9: 5917–5927.
55. Monagas M., Khan N., Andrés-Lacueva C., Urpi-Sardí M., Vázquez-Agell M., Lamuela-Raventós R.M. et al. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Nutr* 2009; 102: 2: 201–206.
56. Kalbag S.S., Palekar A.G. Sodium benzoate inhibits fatty acid oxidation in rat liver: effect on ammonia levels. *Biochem Med Metab Biol* 1988; 40: 2: 133–142.
57. Lin J., Smith M.P., Chapin K.C., Baik H.S., Bennett G.N., Foster J.W. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 9: 3094–3100.
58. Lambert L.A., Abshire K., Blankenhorn D., Slonczewski J.L. Proteins induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *J Bacteriol* 1997; 179: 23: 7595–7599.
59. Higgins C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 67–113.
60. Sterkova J., Poledne R., Hubacek J.A. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* 2004; 53: 3: 235–243.
61. Higgins C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res Microbiol* 2001; 152: 3–4: 205–210.
62. Tamai I., Sai Y., Ono A., Kido Y., Yabuuchi H., Takanaga H. et al. Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 10: 1–9.
63. Cong D., Fong A.K., Lee R., Pang K.S. Absorption of benzoic acid in segmental regions of the vascularly perfused rat small intestine preparation. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 12: 1539–1547.
64. Vellonen K.S., Häkli M., Merezhinskaya N., Tervo T., Honkakoski P., Urtti A. Monocarboxylate transport in human corneal epithelium and cell lines. *Eur J Pharm Sci* 2010; 39: 4: 241–247.
65. Ganapathy V., Thangaraju M., Gopal E., Martin P.M., Itagaki S., Miyauchi S. et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J* 2008; 10: 1: 193–199.
66. Juel C., Halestrap A.P. Lactate transport in skeletal muscle – role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 1999; 517: Pt 3: 633–642.
67. Meredith D., Christian H.C. The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* 2008; 38: 7–8: 1072–1106.
68. Poole R.C., Halestrap A.P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993; 264: 4 Pt 1: 761–782.
69. Kang K.W., Jin M.J., Han H.K. IGF-I receptor gene activation enhanced the expression of monocarboxylic acid transporter 1 in hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 4: 1352–1355.
70. Halestrap A.P., Meredith D. The SLC16 gene family from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004; 447: 5: 619–628.
71. Аливердиева Д.А. Дикарбоксилатные переносчики дрожжей: некоторые особенности структуры и субстратная специфичность. *Вест Дагестан научн центра* 2008; 32: 21–28.
72. Morris M.E., Felmlee M.A. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *AAPS J* 2008; 10: 2: 311–321.
73. Majumdar S., Gunda S., Pal D., Mitra A.K. Functional activity of a monocarboxylate transporter, MCT1, in the human retinal pigmented epithelium cell line, ARPE-19. *Mol Pharm* 2005; 2: 2: 109–117.
74. Kimura O., Tsukagoshi K., Endo T. Uptake of phenoxyacetic acid derivatives into Caco-2 cells by the monocarboxylic acid transporters. *Toxicol Lett* 2009; 189: 2: 102–109.
75. Vaidyanathan J.B., Walle T. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (–)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 2: 745–752.
76. Современная микробиология. Прокариоты / Ленгелера Й., Дрекса Г., Шлегеля Г. М.: Мир; 2009. 1.
77. Johnson B. F., Stanier R.Y. Regulation of the β -ketoadipate pathway in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 1971; 107: 2: 476–485.
78. Collier L.S., Gaines G.L. 3rd, Neidle E.L. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol* 1998; 180: 9: 2493–2501.
79. Harayama S., Rekik M., Bairoch A., Neidle E.L., Ornston L.N. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal benABC and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid xylXYZ, genes encoding benzoate dioxygenases. *J Bacteriol* 1991; 173: 23: 7540–7548.
80. Grund E., Knorr C., Eichenlaub R. Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 5: 1459–1464.
81. Anderson A.J., Harvey A.L. Effects of the facilitatory compounds catechol, guanidine, noradrenaline and phencyclidine on presynaptic currents of mouse motor nerve terminals. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1988; 338: 2: 133–137.
82. Department of Health and Human Services. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 1993.
83. Catechol (ICSC:0411). Prepared in the context of cooperation between the International Programme on Chemical Safety and the Commission of the European Communities © IPCS. CEC. 2005.
84. Andersen F.A. Amended final report on the safety assessment of pyrocatechol. *International J Toxicology* 1997; 16: 1: 11–58.
85. Rafter L.J., Knapp B., Haehnel W., Fuchs G. Coenzyme A-dependent aerobic metabolism of benzoate via epoxide formation. *J Biol Chem* 2010; 285: 27: 20615–20624.
86. Harwood C.S., Gibson J. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *J Bacteriol* 1997; 179: 2: 301–309.
87. Gibson J., Harwood C.S. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 1: 345–369.
88. Mohapatra P.K. Textbook of Environmental Biotechnology. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.; 2006.
89. Dakin J.D. The fate of sodium benzoate in the human organism. *J Biol Chem* 1910; 7: 103–108.
90. Граник В.Г. Метаболизм эндогенных соединений. М.: Вузовская книга; 2006.
91. Wikoff W.R., Anfora A.T., Liu J., Schultz P.G., Lesley S.A., Peters E.C., Siuzdak G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 10: 3698–3703.
92. SIDS Initial Assessment Report for 13th SIAM. Benzoates: Benzoic Acid, Sodium Benzoate, Potassium Benzoate, Benzyl alcohol. 2001.
93. Temellini A., Mogavero S., Giulianotti P.C., Pietrabissa A., Mosca F., Pacifici G.M. Conjugation of benzoic acid with glycine in human liver and kidney: a study on the interindividual variability. *Xenobiotica* 1993; 23: 12: 1427–1433.
94. Deguchi T., Takemoto M., Uehara N., Lindup W.E., Suenaga A., Otagiri M. Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 2: 932–938.
95. Mutsaers H.A., van den Heuvel L.P., Ringens L.H., Dankers A.C., Russel F.G., Wetzel J.F., et al. Uremic toxins inhibit transport by breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 4 at clinically relevant concentrations. *PLoS One* 2011; 6: 4: e18438.
96. Hani E.K., Chan V.L. Expression and characterization of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (hippuricase) gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; 177: 9: 2396–2402.
97. World Health Organization. Food additive series 37: toxicological evaluation of ceratin food additives: benzyl acetate, benzyl alcohol, benzaldehyde, and benzoic acid and its salts. Geneva: 1996.

98. Clemens P.C., Schünemann M.H., Hoffmann G.F., Kohlschütter A. Plasma concentrations of phenyllactic acid in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13: 2: 227—228.
99. Enns G.M., Berry S.A., Berry G.T., Rhead W.J., Brusilow S.W., Hamosh A. Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N Engl J Med* 2007; 356: 22: 2282—2292.
100. Green T.P., Mirkin B.L. Sodium benzoate in the treatment of hyperammonemia in newborns. *Pediatric Research* 1981; 15: 630.
101. Schiff D., Chan G., Stern L. Fixed drug combinations and the displacement of bilirubin from albumin. *Pediatrics* 1971; 48: 1: 139—141.
102. Mu Y., Lin J., Liu R. Interaction of sodium benzoate with trypsin by spectroscopic techniques. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011; 81: 1: 130—135.
103. Tremblay G.C., Qureshi I.A. The biochemistry and toxicology of benzoic acid metabolism and its relationship to the elimination of waste nitrogen. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 1: 63—90.
104. Praphanphoj V., Boyadjev S.A., Waber L.J., Brusilow S.W., Geraghty M.T. Three cases of intravenous sodium benzoate and sodium phenylacetate toxicity occurring in the treatment of acute hyperammonaemia. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23: 2: 129—136.
105. SCCNFP/0532/01, final. Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers. 2002.
106. Garrahou G., Morén C., López S., Tobías E., Cardellach F., Miró O. et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis* 2012; 205: 3: 392—400.
107. Protti A., Singer M. Bench-to-bedside review: potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure. *Crit Care* 2006; 10: 5: 228.
108. Russel A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food pharmaceutical preservatives. *J Appl Bacteriol* 1991; 71: 3: 191—201.
109. Borawska M. H., Czechowska S. K., Markiewicz R., Palka, J., Świsłocka R., Lewandowski W. Antimicrobial activity and cytotoxicity of picolinic acid and selected picolines as new potential food preservatives. *Pol J Food Nutr Sci* 2008; 58: 4: 415—418.
110. Hsiao C. P., Siebert K. J. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 3: 189—201.

**АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ:
ПОЛЕЗНА ИЛИ ВРЕДНА ЭТА СВЯЗЬ В МИРЕ
БАКТЕРИЙ? ОБЗОР.**

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE:
A SUCCESSFUL OR DELETERIOUS ASSOCIATION
IN THE BACTERIAL WORLD? / A. BECEIRO, M. TOMÁS,
G. BOU*. REVIEW // CLINICAL MICROBIOLOGY
REVIEWS APRIL 2013; 26: 2: 185—230.**

Организм-хозяин и бактерии сосуществуют свыше миллиона лет, на протяжении которых бактерии модифицировали механизмы вирулентности, чтобы приспособиться к системе защиты хозяина. Несмотря на то, что распространению патогенов препятствовало открытие и широкое использование антибиотиков, рост антибиотикоустойчивости наблюдается в глобальном масштабе. Появление устойчивых бактерий в последние годы ускоряется, главным образом, в результате селективного прессинга. Хотя устойчивость к антибиотикам и вирулентность бактерий развиваются в разных временных масштабах (time-scale), они имеют некоторые общие черты. В обзоре рассматривается, как устойчивость к антибиотикам влияет на вирулентность и фитнесс, а также как различные генетические механизмы (коселекция и компенсаторные мутации) и наиболее распространённые глобальные изменения, в свою очередь, влияют на связь вирулентность — устойчивость. Взаимодействие между этими факторами и связанная с ними «биологическая цена» зависят от 4 главных факторов: вида бактерии, механизмов вирулентности и устойчивости, экологической ниши и организма-хозяина. Разработка стратегий, использующих новые антибиотики и не антибиотические соединения, а также новые диагностические методы, сфокусированные на выявлении клонов высокого риска и быстром тестировании маркёров вирулентности, может помочь решить возрастающую проблему связи между вирулентностью и устойчивостью патогенных бактерий.

* Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC, A Coruña, Spain; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), Spain.

**OXA-235, НОВАЯ β -ЛАКТАМАЗА КЛАССА D,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ
ACINETOBACTER BAUMANNII К КАРБАПЕНЕМАМ.**

**OXA-235, A NOVEL CLASS D β -LACTAMASE INVOLVED
IN RESISTANCE TO CARBAPENEMS IN ACINETOBACTER
BAUMANNII / P. G. HIGGINS*, F. J. PÉREZ-LLARENA,
E. ZANDER, A. FERNÁNDEZ, G. BOU, H. SEIFERT //**

**ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY
MAY 2013; 57: 5: 2121—2126.**

Исследовали механизм устойчивости к карбапенемам у 10 штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в США и Мексике в 2005—2009 гг. Определение методом ПЦР генов известных металло-бета-лактамазы или гидролизующей карбапенемы оксациллиназы (OXA) дало отрицательные результаты. С помощью трансформации *A. baumannii* ATCC 7978 исследовали наличие генов устойчивости к карбапенемам, кодированных на плазмиде. Были выполнены эксперименты по «shotgun» клонированию и секвенированию, с последующей экспрессией новой бета-лактамазы. Были идентифицированы три новых OXA фермента, у 8 штаммов — OXA-235 и по одному штамму с аминокислотными вариантами OXA-236 (Glu-173-Val) и OXA-237 (Asp208-Gly). Дедуцированные аминокислотные последовательности имели 85% идентичности с OXA-134, 54—57% идентичности с приобретёнными OXA-23, OXA-24, OXA-58 и OXA-143, а также 56% идентичности с природной OXA-51, таким образом они представляют новый подкласс OXA. Экспрессия OXA-235 у *A. baumannii* ведёт к снижению чувствительности к карбапенемам, но не влияет на значение МПК цефалоспоринов. Генетический анализ показал, что *bla*_{OXA-235}, *bla*_{OXA-236}, и *bla*_{OXA-237} были вставлены между двумя *IS**Aba1* инсерционными последовательностями. Присутствие указанных приобретённых бета-лактамазных генов может быть результатом внутриврохромосомной транслокации. Это подчёркивает склонность *A. baumannii* к приобретению детерминант множественной устойчивости к карбапенемам.

* Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany.

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ЛИТОВСКИХ БОЛЬНИЦАХ
УСТОЙЧИВОГО К КАРБАПЕНЕМАМ ACINETOBACTER
BAUMANNII, НЕСУЩЕГО ПЛАЗМИДУ С ДВУМЯ
ГЕНАМИ, КОДИРУЮЩИМИ OXA-72
КАРБАПЕНЕМАЗУ.**

**SPREAD OF CARBAPENEM-RESISTANT
ACINETOBACTER BAUMANNII CARRYING
A PLASMID WITH TWO GENES ENCODING OXA-72
CARBAPENEMASE IN LITHUANIAN HOSPITALS /
J. POVILONIS, V. ŠEPUTIENĖ, R. KRASAUSKAS,
R. JUŠKAITĖ, M. MIŠKINYTĖ, K. SUŽIEDĖLIS,
E. SUŽIEDĖLIENĖ* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
CHEMOTHERAPY 2013; 68: 5: 1000—1006.**

Задачей исследования было изучить молекулярную эпидемиологию штаммов *Acinetobacter bau-*

mannii, выделенных в литовских больницах, уделяв особое внимание характеристике плазмид и генов антибиотикоустойчивости, а также связи их с европейскими клонами (ЕК) I и II. Для характеристики *A.baumannii* использовали методы гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE), ПЦР — анализ ЕК и генов устойчивости, типирование плазмидного репликона, трансформацию ДНК и секвенирование. Из 440 изученных штаммов 230 (52%) и 202 (45%) принадлежали к ЕК I и II соответственно, и демонстрировали клонно-специфический генный профиль устойчивости. В штаммах *A.baumannii* было обнаружено пять плазмид размером от 6 до 100 тпн в различном сочетании (от одной до четырёх), наиболее часто обнаруживались: у ЕК I штаммов плазмиды 9+70 тпн (60%, 137/230), у ЕК II штаммов — плазида 11 тпн (52%, 106/202). Было установлено, что из выявленных групп репликонов GR2 и GR6, по отдельности или в комбинации, в ЕК I преобладали GR2+GR6 (90%, 206/230), а в ЕК II — GR2 (56%, 113/202). Подавляющее большинство (95%, 165/174) карбапенемоустойчивых штаммов ЕК II содержали плазмиду GR2-типа размером 11 тпн, обозначенную как pAB120, которая содержала две копии гена *bla_{OXA-72}*, фланкированные сайтами XerC/XerD-типа и обеспечивающие устойчивость к карбапенемам при введении в чувствительный к карбапенемам штамм *A.baumannii*. Распространение карбапенемоустойчивых *A.baumannii* в литовских больницах ассоциируется, главным образом, с ЕК II штаммами, несущими GR2 плазмиду, кодирующую два гена *bla_{OXA-72}*. Генетическое окружение pAB120 играет роль сайт-специфической рекомбинации, связанной с приобретением бета-лактамаз класса D, гидролизующих карбапенемы.

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University, M. K. Ciurlionio 21, Vilnius LT-03101, Lithuania.

В СТОЧНЫХ ВОДАХ БОЛЬНИЦЫ ОБНАРУЖЕН *ACINETOBACTER JOHNSONII*, СОДЕРЖАЩИЙ *BLA_{NDM-1}*

BLA_{NDM-1}-CARRYING *ACINETOBACTER JOHNSONII*
DETECTED IN HOSPITAL SEWAGE / Z. ZONG*,
X. ZHANG // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
CHEMOTHERAPY 2013; 68: 5: 1007—1010.

Были обследованы сточные воды больницы на присутствие в них *bla_{NDM}*. В колониях, выросших на чашках, содержащих меропенем и засеянных штрихованием сточными водами, *bla_{NDM}* выявлялись с помощью ПЦР. Идентификация видов была

выполнена секвенированием генов 16S рРНК. Клональную принадлежность штаммов определяли энтеробактериальным повторным интергенным консенсусом сиквенс-ПЦР, секвенированием *recA* и PFGE. С помощью скрещивания была сделана попытка получить трансмиссивные плазмиды, несущие *bla_{NDM}*. Генетическое окружение *bla_{NDM}* было исследовано ПЦР картированием, с использованием в качестве стандарта pNDM-BJ01, *bla_{NDM-1}*-несущей плазмиды из *Acinetobacter lwoffii*. Два штамма *Acinetobacter johnsonii*, обозначенные как XBB1 и XBC1, выделенные из сточных вод, содержали *bla_{NDM}*, но имели разное клональное происхождение. В обоих случаях *bla_{NDM-1}* находился на трансмиссивной плазмиде. ПЦР-картирование и секвенирование выявили, что у XBB1 *bla_{NDM-1}*-несущая плазида, pXBB1, была такой же, как pNDM-BJ01, тогда как плазида у XBC1, pXBC1, была вариантом pNDM-BJ01. В pXBC1 отсутствовал большой участок на 5'-3' конце, включая *groES/groEL*, *ISCR27* и *ISAbal25*. В pXBB1 *bla_{NDM-1}* находился в сложном транспозоне Tn125, сформированном *ISAbal25*, который был встроен в последовательность *aphA6* на 5'—3' конце. Итак, сточные воды китайской больницы содержали *bla_{NDM-1}*, то есть они представляют собой важный, но часто выпадающий из поля зрения резервуар детерминант антибиотикоустойчивости. Различная локализация *bla_{NDM-1}* у разных видов *Acinetobacter* представляет собой, вероятно, не односложный процесс. Идентификация *bla_{NDM-1}*-несущей плазмиды pNDM-BJ01/pXBB1 и её вариантов даёт основание полагать, что общая плазида перемещалась между различными видами бактерий-хозяев в различные локусы.

* Centre of Infectious Diseases, West China Hospital (Huaxi), Guoxuexiang 37, Chengdu 610041, China.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАРОПЕНЕМА В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРА КАРБАПЕНЕМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У ENTEROBACTERIACEAE.

USE OF FAROPENEM AS AN INDICATOR
OF CARBAPENEMASE ACTIVITY IN THE
ENTEROBACTERIACEAE / K. M. DAY, R. PIKE,
T. G. WINSTANLEY, C. LANYON, S. P. CUMMINGS,
M. W. RAZA, N. WOODFORD, J. D. PERRY* //
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY JUNE 2013;
51: 6: 1881—1886.

Определяли возможность тестирования чувствительности Enterobacteriaceae с целью прогнозирования карбапенемазной активности, используя диско-диффузионный метод с фаропенемом (10 мкг). Из различных источни-

ков была составлена коллекция из 166 штаммов Enterobacteriaceae, продуцирующих карбапенемазу (КПЭ), и 82 штаммов Enterobacteriaceae, образующих другие бета-лактамазы. Тестирование чувствительности осуществляли по методологии CLSI / EUCAST с помощью дисков, содержащих фаропенем (10 мкг), темоциллин (30 мкг) и 4 других карбапенема (каждый по 10 мкг). Дальнейшую проспективную оценку тестирования чувствительности с фаропенемом выполняли на 205 штаммах, переданных в референс-лабораторию Великобритании для параллельного определения карбапенемазы молекулярными методами. Из 166 КПЭ штаммов 99% имели чёткие границы зоны подавления роста при использовании дисков, содержащих 10 мкг фаропенема, тогда как у продуцентов других бета-лактамаз этот показатель составил только 6% (99% чувствительность, 94% специфичность). «Двойные зоны» вокруг дисков с фаропенемом часто наблюдались у продуцентов ОХА-48. Из карбапенемов лучшим индикатором карбапенемазной активности был имипенем с 99% чувствительностью и 85% специфичностью при размере зоны ≤ 23 мм в диаметре. Отсутствие зоны подавления роста вокруг диска с 30 мкг темоциллина было характерной чертой штаммов, продуцирующих ОХА-48 карбапенемазу. Из 205 штаммов, переданных в референс-лабораторию Великобритании, 84 из 86 штаммов по характеру роста вокруг дисков, содержащих 10 мкг фаропенема, были чётко идентифицированы как продуценты карбапенемазы (98% чувствительность при 87% специфичности). Итак, тестирование чувствительности с дисками, содержащими 10 мкг фаропенема, является простым, удобным и высокопрогностическим методом для выявления Enterobacteriaceae, продуцирующих карбапенемазу.

*Microbiology Department, Freeman Hospital, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.

IN VITRO АКТИВНОСТЬ БИАПЕНЕМА + RPX7009, КОМБИНАЦИИ КАРБАПЕНЕМА С ИНГИБИТОРОМ СЕРИНОВОЙ β -ЛАКТАМАЗЫ, В ОТНОШЕНИИ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ.

IN VITRO ACTIVITY OF BIAPENEM PLUS RPX7009, A CARBAPENEM COMBINED WITH A SERINE β -LACTAMASE INHIBITOR, AGAINST ANAEROBIC BACTERIA / E. J. C. GOLDSTEIN*, D. M. CITRON, K. L. TYRRELL, C. VRENI MERRIAM // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JUNE 2013; 57: 6: 2620-2630.

Разработана комбинация карбапенемного антибиотика биапенема с RPX7009, новым ингибитором сериновой бета-лактамазы. Биапенем и

его комбинация с фиксированной концентрацией RPX7009 были испытаны методом разведений в агаре в отношении 377 свежeweделенных штаммов анаэробов. Отдельно была протестирована коллекция из 27 штаммов *Bacteroides* spp. с пониженной чувствительностью к имипенему; антибиотиками сравнения были меропенем, пиперациллин-тазобактам, ампициллин-сулбактам, цефокситин, цефтазидим, метронидазол, клиндамицин, тигециклин+имипенем, дорипенем и эртапенем. Для свежeweделенных последовательных штаммов *Bacteroides* spp. МПК₉₀ биапенема + RPX7009 составляла 1 мкг/мл, а МПК₉₀ меропенема — 4 мкг/мл. Для других видов группы *Bacteroides fragilis* МПК₉₀ обоих антибиотиков была равна 0,5 мкг / мл. Значения МПК₉₀ биапенема + RPX7009 составили 0,25 мкг/мл для *Prevotella* spp., 0,125 мкг/мл — *Fusobacterium nucleatum* и *Fusobacterium necrophorum*, 2 мкг/мл — *Fusobacterium mortiferum*, 0,5 мкг/мл — *F. varium*, $\geq 0,5$ мкг/мл — грамположительных кокков и палочек и 0,03 — 8 мкг/мл — клостридий. Активность биапенема с RPX7009 в отношении 5 штаммов *B. fragilis*, содержащих известную металло-бета-лактамазу, была сравнима с активностью других карбапенемов (≤ 32 мкг/мл). У штаммов *Bacteroides* с МПК имипенема 2 мкг/мл, МПК биапенема + RPX7009 была в пределах 4—16 мкг/мл при МПК меропенема, дорипенема и эртапенема от 8 до > 32 мкг/мл. У штаммов с МПК имипенема, равной 4 мкг/мл, значения МПК биапенема + RPX7009 составляли 4—16 мкг/мл при МПК меропенема, дорипенема и эртапенема от 8 до > 32 мкг/мл. Ингибитор RPX7009 не обладал антимикробной активностью при тестировании и не усиливал или слабо усиливал активность биапенема в отношении анаэробов. Активность биапенема + RPX7009 была сравнима с активностью имипенема, но превосходила активность меропенема, дорипенема и эртапенема в отношении не чувствительных к имипенему штаммов *Bacteroides* spp.

* R. M. Alden Research Laboratory, Culver City, California, USA.

* David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, California, USA.

РОЛЬ СИСТЕМЫ ПОГЛОЩЕНИЯ FE И AMPC БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA К СИДЕРОФОРУ МОНОСУЛЬФАКТАМА BAL30072.

INVOLVEMENT OF FE UPTAKE SYSTEMS AND AMPC β -LACTAMASE IN SUSCEPTIBILITY TO THE siderophore MONOSULFACTAM BAL30072 IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA / C. VAN DELDEN,

M. G. P. PAGE, T. KOHLER* // **ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY** MAY 2013; 57: 5: 2095—2102.

BAL30072 — моносультфактам, соединённый с ди-гидропиридоновой группой, образующей хелаты с железом. Он активен в отношении грамотрицательных бактерий, включая *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью. В различных условиях были отобраны мутанты *P. aeruginosa* PAO1 с пониженной чувствительностью к BAL30072. В условиях дефицита железа преобладали мутанты со сверхэкспрессией AmpC бета-лактамазы, которые были перекрестно устойчивы к азтреонаму и цефтазидиму. Такие же мутанты были получены после селекции с >16 МПК при достаточном содержании железа. При экспозиции с 4—8 МПК значение МПК BAL30072 возрастало при неизменном значении МПК азтреонама и ципрофлоксацина. Экспрессия *ampC* и генов насоса выброса также не изменялась. Эти специфические BAL30072 мутанты были охарактеризованы с помощью транскриптомного анализа, который выявил активацию Fe-дицитратного оперона, *FecIRA*. Секвенирование целого генома показало, что это является результатом замещения одного нуклеотида в *Fur*-боксе *fecI* промотора. Сверхэкспрессия *FecI* ECF сигма фактора или *FecA* рецептора увеличивала МПК BAL30072 в 8—16 раз. Мутанты *fecI* и *fecA* штамма PAO1 были сверхчувствительны к BAL30072 (МПК < 0,06 мкг/мл). Ген с самой высокой супрессирующей активностью принадлежал оперону синтеза пиохелина, хотя мутанты по генам рецептора или синтеза пиохелина не изменяли значения МПК. Ген *riuC*, кодирующий Fe(II)-зависимую диоксигеназу, следующий за геном рецептора железа, *riuA*, обладал также супрессирующим действием. Значения МПК BAL30072 в отношении *riuC* и *riuA* мутантов транспозона повышались, соответственно, в 8 и 16 раз. По полученным результатам можно заключить, что активация Fe-дицитратной системы влияет на экспрессию других TonB-зависимых транспортёров железа, а *RiuA* и *RiuC* вносят свой вклад в чувствительность *P. aeruginosa* PAO1 к антибиотику BAL30072.

* Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ СИДЕРОФОРА МОНОСУЛЬФАКТАМА BAL30072 И КАРБАПЕНЕМОВ НА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.

COMBINED EFFECTS OF THE SIDEROPHORE MONOSULFACTAM BAL30072 AND CARBAPENEMS

ON MULTIDRUG-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACILLI / B. HOFER, C. DANTIER, K. GEBHARDT, E. DESARBRE, A. SCHMITT-HOFFMANN, M. G. P. PAGE* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 5: 1120—1129.

Устойчивость грамотрицательных бактерий к карбапенемам, связанная с нарушением системы поглощения антибиотиков и действием бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы, представляет всё возрастающую проблему. Моносультфактамный антибиотик BAL30072 устойчив к большинству карбапенемаз и, вероятно, может дополнить действие карбапенемов. Исследовали антимикробную активность BAL30072 в сочетании с имипенемом, меропенемом, дорипенемом. *In vitro* активность комбинаций оценивали методами микроразведений в бульоне, диско-диффузионным методом, титрованием разведений в бульоне, способом «шахматной доски» и определением динамики гибели клеток (time-kill). Были использованы штаммы Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter*, имеющие значения МПК карбапенема ≥ 2 мг/л. Комбинации были эффективны в отношении 70—80% испытанных штаммов при концентрации каждого антибиотика 1 мг/л, тогда как по отдельности карбапенемы были неэффективны, а BAL30072 был эффективен в отношении 20—40% штаммов. Синергидный эффект наблюдали в отношении многих Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa*, в меньшей степени — в отношении *Acinetobacter*, хотя аддитивное действие, когда один компонент компенсирует недостаток активности другого, было общим. Ни в одной из протестированных комбинаций не было отмечено антагонистического взаимодействия, которое часто наблюдается с другими беталактамами. Опыты на моделях септицемии у животных, показали, что синергизм комбинации BAL30072 и меропенема, наблюдаемый *in vitro*, проявляется *in vivo* с большей эффективностью. Таким образом, комбинации BAL30072-карбапенем были эффективнее в отношении широкого круга грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, чем отдельно взятые антибиотики. Аддитивный и синергидный эффект наблюдали в отношении Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa*, усиление активности часто сопровождалось подавлением развития устойчивости. Активность *in vitro* проявлялась *in vivo* с большей эффективностью.

* Basilea Pharmaceutica International Ltd, Grenzachstrasse 487, CH-4058 Basel, Switzerland.

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛИМИКСИНОВ. ОБЗОР.

NOVEL DERIVATIVES OF POLYMYXINS. REVIEW / M. VAARA* / JOURNAL

Полимиксин В и колистин (полимиксин Е) являются пентакатионными липопептидами, специфически действующими на грамотрицательные бактерии, сначала разрушая наружный барьер проницаемости — наружную мембрану (НМ), а затем — цитоплазматическую мембрану. Оба полимиксина были открыты в середине 1950 гг. и использовались для в/в терапии, но вскоре от них отказались из-за нефротоксичности. Появление мультирезистентных штаммов заставило врачей вернуть их в практику лечения тяжёлых инфекций, вызванных такими штаммами. В обзоре приведены сведения о современных попытках разработать новые производные полимиксинов с меньшей токсичностью и большей активностью, чем существующие препараты. Приведены результаты исследований новых полимиксинов, лишённых ацильного радикала жирных кислот, активных в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Обзор включает последние исследования производных полимиксинов с недостаточной бактерицидной активностью, но способных, разрушая НМ, увеличивать её проницаемость для других антибиотиков, облегчая попадание их внутрь клетки.

* Division of Clinical Microbiology, Helsinki University Hospital, FI-00029 HUSLAB, Helsinki, Finland.

* Northern Antibiotics Ltd, FI-00720 Helsinki, Finland.

РОЛЬ СИНЕРГИДНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОЛИСТИНА И БАКТЕРИОЦИНОВ В КОНТРОЛЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ И В СПОСОБНОСТИ СНИЖАТЬ ТОКСИЧНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ.

SYNERGISTIC EFFECT BETWEEN COLISTIN AND BACTERIOCINS IN CONTROLLING GRAM-NEGATIVE PATHOGENS AND THEIR POTENTIAL TO REDUCE ANTIBIOTIC TOXICITY IN MAMMALIAN EPITHELIAL CELLS / K. NAGHMOUCHI, J. BAAH, D. HOBER, E. JOUY, C. RUBRECHT, F. SANÉ, D. DRIDER* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JUNE 2013; 57: 6: 2719—2725.

Устойчивость патогенных бактерий к большинству используемых антибиотиков является индикатором необходимости разработки новых антимикробных и антиинфекционных препаратов и создания инновационных стратегий преодоления резистентности. Задачей исследования было оце-

нить *in vitro* активность колистина и комбинации его с двумя бактериоцинами, низином А и педиоцином PA-1/AcH в отношении *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 и *Escherichia coli* ATCC 35150 (O157:H7). Наиболее чувствительным к колистину был энтерогеморрагический штамм *E.coli* O157:H7, который подавлялся колистином при концентрации 0,12 мкг/мл. При добавлении к колистину низина А (1,70 мкг/мл) или педиоцина PA-1/AcH (1,56 мкг/мл) концентрации колистина, необходимые для подавления *E.coli* O157:H7, были равны, соответственно 0,01 и 0,03 мкг/мл. Антигенотоксическое действие колистина *in vitro* определяли методом кометного анализа, измеряющим степень разрушения ДНК у свежывыделенных лейкоцитов периферической крови (ЛПК) человека после 1 час. инкубации с колистином при 37°C. Изменения размера «хвоста» ЛПС примерно на $69,29 \pm 0,08$ мкм наблюдали при конечной концентрации колистина 550 нг/мл. В опытах на Vero клетках, помимо демонстрации синергидного эффекта, авторы смогли переоценить токсическое действие комбинации колистина (1 мкг/мл) и низина (2 мкг/мл).

* Laboratoire ProBioGEM, Polytech'Lille / IUT «А», Université de Lille Nord de France, Villeneuve d'Ascq, France.

ВНУТРИЖЕЛУДОЧКОВЫЙ (ИНТРАВЕНТРИКУЛЯРНЫЙ) И ВНУТРИОБОЛОЧЕЧНЫЙ (ИНТРАТЕКАЛЬНЫЙ) КОЛИСТИН КАК ПОСЛЕДНЕЕ СРЕДСТВО ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВЕНТРИКУЛИТА И МЕНИНГИТА, ВЫЗВАННЫХ ACINETOBACTER BAUMANNII С МНОЖЕСТВЕННОЙ И ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

INTRAVENTRICULAR AND INTRATHECAL COLISTIN AS THE LAST THERAPEUTIC RESORT FOR THE TREATMENT OF MULTIDRUG-RESISTANT AND EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII VENTRICULITIS AND MENINGITIS: A LITERATURE REVIEW / I. KARAIKOS, L. GALANI, F. BAZIAKA, H. GIAMARELLOU* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2013; 41: 6: 499—508.

В настоящее время из-за появления штаммов *Acinetobacter baumannii* с множественной (MDR) и широкой масштабной (XDR) лекарственной устойчивостью особую важность приобретает лечение вентрикулита/менингита. Представлен обзор литературы по внутрижелудочковому (ВЖ) и внутриоболочечному (ВО) введению колистина при вентрикулите/менингите, вызванным MDR и XDR *A.baumannii*. Всего установлено 83 эпизода у

81 больного (71 случай у взрослых и 10 случаев у детей и новорожденных), число введений колистина ВЖ и ВО составило, соответственно 52 и 22, способ введения в 7 случаях не установлен. Средняя доза местно введённого колистина составила 125000 IE (10 мг): у взрослых в пределах 20000 IE (1,6 мг) — 500000 IE (40 мг), в детской популяции пределы доз составляли 2000 IE (0,16 мг/кг) — 125000 IE (10 мг). Средняя продолжительность лечения ВЖ/ВО полимиксином Е составила 18,5 дней, а среднее время стерилизации СМЖ — 4 дня. Успешный исход лечения был у 89% больных; о токсичности, проявляющейся в форме обратимого химического вентикулита / менингита сообщалось в 9 случаях (11%). В настоящее время ВЖ и ВО введение колистина представляется последним средством лечения вентикулита/менингита, обусловленного MDR и XDR *A.baumannii*, и обеспечивает уникальную более безопасную и успешную терапию.

* 6th Department of Internal Medicine, Hygeia General Hospital, 4 Erythrou Stavrou Str. & Kifisias Av., Marousi 15123, Athens, Greece.

СИНЕРГИЗМ КОЛИСТИНА И ЭХИНОКАНДИНОВЫХ АНТИМИКОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ *CANDIDA* SPP.

SYNERGY OF THE ANTIBIOTIC COLISTIN WITH ECHINOCANDIN ANTIFUNGALS IN *CANDIDA SPECIES* / U. ZEIDLER, M.-E. BOUGNOUX, A. LUPAN, O. HELYNCK, A. DOYEN, Z. GARCIA, N. SERTOUR, C. CLAUDAUD, H. MUNIER-LEHMANN*, C. SAVEANU*, C. D'ENFERT* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 6: 1285—1296.

Candida albicans — наиболее часто встречающийся патогенный грибок у человека, вызывающий широкий круг заболеваний, от наружных поражений до тяжёлых системных инфекций. Поскольку применение существующих антимикотиков ограничено их эффективностью, токсичностью и устойчивостью к ним, необходимо усовершенствование противогрибкового арсенала. Была проведена идентификация соединений, синергидно взаимодействующих с эхинокандиновыми антимикотиками и способных ускорить снижение грибковой нагрузки. Всего было протестировано 38758 соединений на их способность к синергидному взаимодействию с представителем семейства эхинокандинов, аминокандин, ингибитором β -1,3-глюкан синтазы. Синергизм между эхинокандинами и определённым соединением исследовали химиогеномным отбором и тестированием на отдельных мутантных штаммах *Saccharomyces cerevisiae* и *C.albicans*. Было показано, что колистин, действующий на мембраны грамотрицатель-

ных бактерий, в сочетании с представителями семейства антимикотиков — эхинокандинами оказывает синергичное действие на все испытанные *Candida species*. Действие комбинации аминокандина и колистина приводило к ускоренной и повышенной проницаемости клеточной стенки по сравнению с действием колистина и аминокандина в отдельности. Предпосылкой для проявления синергизма была чувствительность к эхинокандину. Крупномасштабный скрининг генов, обуславливающих природную устойчивость дрожжевых клеток к низким дозам соединений, по отдельности или в комбинации, показал, что биосинтез сфинголипида и хитина является необходимым для защиты клеток *S.cerevisiae* и *C.albicans* от действия антигрибковой комбинации. Полученные результаты являются основанием для предположения, что ослабление клеточной стенки под действием эхинокандина облегчает атаку колистина на мембраны грибка, что, в свою очередь, усиливает действие эхинокандинов.

*Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques-INRA USC 2019, Institut Pasteur, 25—28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

УСТОЙЧИВОСТЬ PHOQ МУТАНТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* К ПОЛИМИКСИНУ ЗАВИСИТ ОТ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ.

POLYMYXIN RESISTANCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PHOQ MUTANTS IS DEPENDENT ON ADDITIONAL TWO-COMPONENT REGULATORY SYSTEMS / A. D. GUTU, N. SGAMBATI, P. STRASBOURGER, M. K. BRANNON, M. A. JACOBS, E. HAUGEN, R. K. KAUL, H. KROGH JOHANSEN, N. HØIBY, S. M. MOSKOWITZ* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY MAY 2013; 57: 5: 2204—2215.

Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к полимиксину может развиваться вследствие мутаций в PhoPQ регуляторной системе как результат ковалентной модификации липида А. В результате мутагенеза транспозона полимиксиноустойчивого *phoQ* мутанта был определён 41 новый локус, необходимый для устойчивости, в т. ч. две регуляторные системы ColRS и CprRS. Делеция генов *colRS*, по отдельности или в тандеме, отменяет устойчивость к полимиксину у Δ *phoQ* мутанта так же, как индивидуальная или тандемная делеция *cprRS*. Индивидуальная делеция *colR* или *colS* у Δ *phoQ* мутанта также подавляет присоединение 4-амино-1-арабинозы к липиду А, что согласуется с известной ролью модификации в устойчивости к полимиксину. Интересно, что тандемная делеция *colRS*

или *cprRS* у $\Delta phoQ$ мутанта или индивидуальная делеция *cprR* или *cprS* не понижает супрессию присоединения 4-амино-1-арабинозы к липиду А, доказывая, что одна эта модификация недостаточна для PhoPQ-опосредованной устойчивости *P.aeruginosa* к полимиксину. Эпизомальная экспрессия *colRS* и *cprRS* в тандеме или индивидуально *cprR* дополняет Pm-фенотип устойчивости $\Delta phoQ$ мутанта, в то время как эпизомальная экспрессия *colR*, *colS*, или *cprS* по отдельности не оказывает такого действия. Высокоустойчивые к полимиксину *phoQ* мутанты *P.aeruginosa*, выделенные от больного муковисцидозом, леченного полимиксином, содержали аллели *colRS* и *cprS*. При экспрессии на фоне $\Delta phoQ$ эти мутантные аллели усиливали устойчивость к полимиксину. Результаты позволяют определить ColRS и CprRS как двухкомпонентные системы, регулирующие устойчивость к полимиксину у *P.aeruginosa*, и означают, что присоединение 4-амино-1-арабинозы к липиду А не является единственным регулируемым биохимическим механизмом, необходимым для устойчивости, и что *colRS* и *cprS* мутации могут вносить вклад в клиническую устойчивость высокого уровня.

* Department of Pediatrics, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕЖИМОВ ЛЕЧЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИХ ВАНКОМИЦИН, В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII*, УСТОЙЧИВЫХ К КОЛИСТИНУ.

ACTIVITIES OF VANCOMYCIN-CONTAINING REGIMENS AGAINST COLISTIN-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* CLINICAL STRAINS / J. A. O'HARA, L. A. AMBE, L. G. CASELLA, B. M. TOWNSEND, M. R. PELLETIER, R. K. ERNST, R. M. Q. SHANKS, Y. DOI* // *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* MAY 2013; 57: 5: 2103–2108.

При лечении инфекций, вызванных *Acinetobacter baumannii* с широко распространённой лекарственной устойчивостью (XDR), часто используют комбинации антибиотиков. Предложены различные варианты комбинаций, для большинства которых основным препаратом служит колистин. Согласно последним данным, гликопептиды, в частности ванкомицин, могут обладать уникальной активностью в отношении лабораторных и клинических штаммов *A.baumannii* как по отдельности, так и в комбинации с колистином. В настоящей работе этот подход был испытан на трёх уникальных устойчивых к колистину клинических штаммах *A.baumannii* с использованием комбинаций ванкомицина, колистина и дорипенема. Все три штамма обладали признаком модифика-

ции фосфоэтаноламиновой части липида А, ассоциирующейся с устойчивостью к колистину, а также уникальными аминокислотными замещениями в PmrAB двухкомпонентной сигнальной трансдукционной системе, чего не наблюдалось у штаммов, чувствительных к колистину. Методом «шахматной доски» был установлен синергизм (определённый как индекс фракционной ингибирующей концентрации, FICI) между колистином и ванкомицином (у всех трёх штаммов) и колистином и дорипенемом (у двух штаммов). По результатам определения динамики гибели клеток (time-kill) комбинации колистина — дорипенема, колистина — ванкомицина и колистина — дорипенема — ванкомицина приводили к полной гибели соответственно 1, 2 и 3 колистиноустойчивых штаммов *A.baumannii*. На модели инфекции восковой моли *Galleria mellonella* комбинации дорипенема — ванкомицина и колистина — дорипенема — ванкомицина значительно повышали выживаемость личинок в сравнении с другими комбинациями и монотерапией. На основании полученных данных можно предположить, что режимы лечения, включающие ванкомицин, могут обеспечить благоприятный терапевтический исход инфекций, обусловленных устойчивым к колистину *A.baumannii*.

* Division of Infectious Diseases, University of Pittsburgh, School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОГО КЛАРИТРОМИЦИНА И ЕГО ДЕЙСТВИЕ НА ВИРУЛЕНТНЫЕ ФАКТОРЫ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

EFFICACY AND SAFETY OF LIPOSOMAL CLARITHROMYCIN AND ITS EFFECT ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VIRULENCE FACTORS / MAI ALHAJLAN, MOAYAD ALHARIRI AND ABDELWAHAB OMRI* // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* JUNE 2013; 57: 6: 2694–2704.

Исследовали эффективность и безопасность липосомальных лекарственных форм кларитромицина (КЛА) с различным поверхностным зарядом в отношении клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из лёгких больного муковисцидозом. Липосомальные лекарственные формы КЛА были приготовлены методом дегидратации-регидратации, размер липосом измеряли динамической световой дисперсией. Эффективность инкапсулирования определяли микробиологическим методом, стабильность лекарственных форм в биологических жидкостях оценивали на 48 час. Значения МПК и МБК (минимальная

бактерицидная концентрация) свободной и липосомальной форм определяли со штаммами *P.aeruginosa*, выделенными от больных муковисцидозом. Активность липосомальной и свободной форм КЛА в отношении штаммов *P.aeruginosa*, образующих биоплёнку, сравнивали на приборе Calgary Biofilm Device (CBD). Действие субингибиторных концентраций свободной и липосомальной форм КЛА на вирулентные факторы и подвижность на агаре изучали на клинических штаммах *P.aeruginosa*. Цитотоксичность липосомального и свободного КЛА определяли на линии A549 лёгочных эпителиальных клеток. Средний диаметр частиц был >222 нм, показатель инкапсулирования от 5,7 до 30,4%. В течение 48 час. липосомы сохраняли более 70% содержащегося в них антибиотика. Высокоустойчивый штамм *P.aeruginosa* становился чувствительным к инкапсулированному в липосомы КЛА (МПК 256 мг/л против 8 мг/л, $p<0,001$). Липосомальный КЛА снижал рост бактерий в биоплёнке на 3–4 log ($p<0,001$), значительно ослаблял образование вирулентных факторов, снижал подёргивание, роение и подвижность бактерий в жидкости. Токсичность КЛА, заключённого в липосомы, была ниже, чем у свободного антибиотика ($p<0,001$). Полученные данные означают, что разработанная новая лекарственная форма может быть полезна для усиления эффективности КЛА в отношении устойчивых штаммов *P.aeruginosa*, которые обычно поражают больных муковисцидозом.

* Novel Drug and Vaccine Delivery Systems Facility, Department of Chemistry and Biochemistry, Laurentian University, Sudbury, Ontario, Canada.

РАЦИОНАЛЬНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ КАТИОННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО АРГИНИН И ТРИПТОФАН, И ИХ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕНОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.

RATIONAL DESIGN OF ENGINEERED CATIONIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES CONSISTING EXCLUSIVELY OF ARGININE AND TRYPTOPHAN, AND THEIR ACTIVITY AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT PATHOGENS / B. DESLOUCHES, J. D. STECKBECK, J. K. CRAIGO, Y. DOI, T. A. MIETZNER*, R. C. MONTELARO // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JUNE 2013; 57: 6: 2511–2521.

Возникновение патогенов с мультилекарственной устойчивостью (MDR) подчёркивает потребность в новых антимикробных препаратах для преодоления механизмов устойчивости таких организмов. Катионные антимикробные пептиды (КАП) представляют мощный источник

новых терапевтических средств. Предварительно была охарактеризована серия участков из литических основных единиц (ЛОЕ) у сконструированных КАП (сКАП), содержащих от 12 до 48 аминокислотных остатков. Максимальной антибактериальной избирательностью действия обладали соединения из 24 остатков. Было отмечено, что Тгр замещения в ЛОЕ увеличивают активность в отношении *P.aeruginosa* и *S.aureus* в определённых условиях (физиологическом растворе, с двухвалентными катионами и в сыворотке). Исходя из этого, было сделано предположение, что оптимальная длина цепи и, следовательно, стоимость сКАП с максимальной активностью в релевантных физиологических условиях могут быть значительно снижены, если для формирования идеальных амфипатических спиралей используются только Arg и Тгр. Была разработана серия новых пептидов, содержащих только Arg и Тгр в последовательности, спрогнозированной и подтверждённой круговым дихроизмом для свёртывания в оптимизированную амфипатическую спираль. Самая высокая антимикробная активность в отношении ряда грамотрицательных и грамположительных клинических штаммов в физиологическом растворе и бульоне при различных значениях pH была получена при длине цепи в 12 остатков (WR12). Результаты экспериментов показали, что рациональное конструирование КАП может привести к существенному снижению длины цепи и числа аминокислотных остатков в пептиде и повысить оптимальную активность и избирательность действия в отношении определённых патогенов.

* Lake Erie College of Osteopathic Medicine at Seton Hill, Greensburg, Pennsylvania, USA.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ GSK1322322, НОВОГО ИНГИБИТОРА ПЕПТИД ДЕФОРМИЛАЗЫ.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF A NOVEL PEPTIDE DEFORMYLASE INHIBITOR, GSK1322322 / K. O'DWYER, M. HACKEL, S. HIGHTOWER, D. HOBAN, S. BOUCHILLON, D. QIN, K. AUBART, M. ZALACAIN*, D. BUTLER* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY MAY 2013; 57: 5: 2333–2342.

Разработан новый ингибитор пептид деформилазы (ИПДФ), GSK1322322, предназначенный для в/в и перорального введения больным с острыми инфекциями кожи и мягких тканей и госпитализированным больным с внебольничной пневмонией. Активность ИПДФ была испытана на международной коллекции клинических штаммов *Haemophilus*

influenzae (n=2370), *Moraxella catarrhalis* (n=115), *Streptococcus pneumoniae* (n=947), *Streptococcus pyogenes* (n=617), и *Staphylococcus aureus* (n=940), включающей штаммы, устойчивые к одному и более коммерческим антибиотикам. МПК₉₀ GSK1322322 для *M.catarrhalis* составила 1 мкг/мл и 4 мкг/мл для *H.influenzae*, причём эта концентрация подавляла рост 88,8% образующих бета-лактамазу штаммов. У всех штаммов *S.pneumoniae* МПК была равна ≤4 мкг/мл GSK1322322, а МПК₉₀ — 2 мкг/мл. Все присутствующие в микроорганизме механизмы устойчивости не влияли на активность GSK1322322, что подтверждалось значением MIC₉₀, равной 1 мкг/мл для пенициллино-, левофлоксацино-, макролидоустойчивых *S.pneumoniae*. GSK1322322 был высокоактивен (MIC₉₀ равна 0,5 мкг/мл) в отношении штаммов *S.pyogenes*, независимо от фенотипа устойчивости к макролидам, а также штаммов *S.aureus* безотносительно их чувствительности к метициллину, макролидам и левофлоксацину, во всех случаях MIC₉₀ составляла 4 мкг/мл. По данным исследования бактерицидной активности GSK1322322 (time-kill) в отношении *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *S.pyogenes* и *S.aureus* при 4МПК, в течение 24 ч число КОЕ/мл у 29 из 33 проверенных штаммов снижалось на ≥3log₁₀. Антибактериальная активность, продемонстрированная в отношении изученного набора микроорганизмов, характеризует GSK1322322 как ценный альтернативный препарат при лечении инфекционных заболеваний, вызванных устойчивыми патогенами.

* Antibacterial Discovery Performance Unit, Infectious Disease Therapeutic Area, GlaxoSmithKline, Collegeville, Pennsylvania, USA.

ВРЕМЯ НАЧАЛА АНТИГРИБКОВОЙ ТЕРАПИИ КАНДИДОЗА У НОВОРОЖДЁННЫХ.

TIME TO INITIATION OF ANTIFUNGAL THERAPY FOR NEONATAL CANDIDIASIS / J. LE*, TU T. TRAN, I. BUI, M. K. WANG, A. VO, F. C. ADLER-SHONET // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JUNE 2013; 57: 6: 2550—2555.

Влияние отложенной антигрибковой терапии у критически больных младенцев не изучено. Предметом исследования было оценить влияние времени начала антигрибковой терапии (ВНАТ) на летальность, диссеминированность заболевания и продолжительность постинфекционного нахождения в стационаре. Было выполнено когортное исследование критически больных младенцев с положительными результатами анализов на *Candida* за период 1990—2008 гг. ВНАТ выражалось в количестве часов от получения первой положительной пробы до начала анти-

грибковой терапии. Из 96 младенцев 57% были мужского пола, средний срок беременности — 27 недель (23—41 неделя), средний вес 956 г (415—6191 г). Большинство пациентов получали амфотерицина В дезоксихолат. У 35% младенцев ВНАТ составляло ≤24 ч, у 42% — 25—48 ч и у 23% — >48 ч. В период госпитализации умерло 11 больных, у 22% был диссеминированный кандидоз. Средняя продолжительность постинфекционного пребывания в стационаре равнялась 53 дням (6—217 дней). Уни- и мультивариантными анализами было показано, что ВНАТ не ассоциировалось с летальностью, диссеминацией инфекции и продолжительностью постинфекционного нахождения в стационаре. Искусственное вентилирование лёгких свыше 60 дней значительно повышало риск летального исхода (odds ratio [OR], 9,5; 95% ДИ, 2,2 до 66,7; p=0,002). Продолжительная кандидемия повышала риск диссеминации инфекции на 10%/день положительной культуральной пробы (OR, 1,1; 95% ДИ, 1,08 до 1,2; p=0,007), а показатель недоношенности ассоциировался с увеличением срока пребывания в ОИТ после первой положительной культуральной пробы на 0,94 недели (95% ДИ, 0,70 до 0,98; p<0,001). Таким образом, не было установлено связи между ВНАТ и всеми случаями летального исхода, диссеминированным кандидозом и продолжительностью постинфекционного пребывания в стационаре.

* University of California at San Diego, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, La Jolla, California, USA.

ОБЩЕЕВРОПЕЙСКИЕ ПРОГРАММЫ МОНИТОРИНГА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У БАКТЕРИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ С ПИЩЕВЫМИ ПРОДУКТАМИ, И ПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ.

PAN-EUROPEAN RESISTANCE MONITORING PROGRAMMES ENCOMPASSING FOOD-BORNE BACTERIA AND TARGET PATHOGENS OF FOOD-PRODUCING AND COMPANION ANIMALS / A. DE JONG*, V. THOMAS U. KLEIN, H. MARION, H. MOYAERT, S. SIMJEE, M. VALLÉ // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS MAY 2013; 41: 5: 403—409.

Устойчивость к антибиотикам касается здоровья и животных, и человека, поэтому ветеринарные программы мониторинга устойчивости возбудителей заболеваний у животных и зоонозных инфекций очень важны. В различных европейских странах существуют национальные наблюдатель-

ные программы, в частности по зоонозным и комменсальным бактериям, а EFSA (Европейское Управление безопасностью пищевых продуктов) обобщает полученные данные. Тем не менее для сравнения данных мониторинга устойчивости в различных странах необходима гармонизация, которой препятствуют различия между программами по методологиям сбора образцов и тестирования, а также по эпидемиологическим и клиническим пограничным значениям. Более того, имеется очень мало надёжных данных, относящихся к определённым патогенам сельскохозяйственных и домашних животных. CEESA (Европейский центр исследования здоровья животных) пытается восполнить эти пробелы. Программы CEESA по мониторингу устойчивости представляют более чем десятилетнее сотрудничество ветеринарных фармацевтических компаний и включают два разных проекта: 1) Европейскую программу по отслеживанию чувствительности к антибиотикам бактерий, собранных на бойне от здоровых животных и передающихся

с пищевыми продуктами (ESSA), и 2) сбор важнейших патогенов от больных животных. Вторым проектом содержат три направления: VetPath; MusoPath; и ComPath. Все CEESA проекты содержат унифицированные методы сбора образцов и идентификации бактерий до вида в странах-членах Европейского союза (ЕС). Центральная лаборатория выполняет количественное определение чувствительности к антибиотикам медицинского назначения и обычно используемых в ветеринарии. Эта «методология гармонизации» позволяет легко выполнять сравнение между странами ЕС и делать программы неопределимыми в вопросах безопасности пищевых продуктов и эффективности антибиотиков.

* CEESA Antimicrobial Resistance Study Groups, Rue Defacqz 1, 1000 Brussels, Belgium.

**Подготовлено
Бондаревой Н. С.**

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

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

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

МИКАМИН®

более одного миллиона

пролеченных пациентов¹



МИКАМИН®
микафунгин



astellas
Свет, ведущий к жизни

Представительство компании «Астеллас Фарма Юроп Б.В.»
(Нидерланды) г. Москва, Россия, 109147, г. Москва,
ул. Марксистская, 16. Тел.: +7 (495) 737-07-55

Инструкция по применению лекарственного препарата
для медицинского применения Микамин®
РУ ЛСР-009005/09 от 29.04.2013

Информация для работников здравоохранения

1. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н. Нежелательные явления,
наблюдаемые при использовании современных
противогрибковых препаратов в лечении инвазивных
микозов. Онкогематология. 2013. №2. С. 47-59.

RUS/MYC/10.2013/BRGS214

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ, ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ НЕОБХОДИМО ОЗНАКОМИТЬСЯ С ИНСТРУКЦИЕЙ