

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 58



9-10'2013

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

9—10'2013

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.
Проф., 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.
Член-корр РАМН, 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., Цвигун Е. А., Бычкова О. П., Лавренов С. Н.
Микробная модель *Halobacterium salinarum* в отборе
синтетических аналогов антибиотика турбомицина А,
обладающих противоопухолевым действием
Разумов И. А., Казачинская Е. И., Пучкова Л. И.,
Косогова Т. А., Горбунова И. А., Локтев В. Б.,
Теплякова Т. В.
Протективная активность водных экстрактов
из высших грибов при экспериментальной
герпесвирусной инфекции у белых мышей
Гостев В. В., Попенко Л. Н., Черненко Т. В.,
Наumenko З. С., Ворошилова Т. М., Захарова Ю. А.,
Хохлова О. Е., Круглов А. Н., Ершова М. Г., Ангелова С. Н.,
Поletaева Е. Д., Молчанова И. В., Сидоренко С. В.
Оценка чувствительности MRSA к оксациллину,
цефокситину, ванкомицину и даптомицину

В помощь практикующему врачу

Кузнецова Т. А., Запорожец Т. С., Беседнова Н. Н.,
Тимченко Н. Ф., Крыжановский С. П., Головачева В. Д.,
Звягинцева Т. Н., Шевченко Н. М.
Эффективность нового синбиотического напитка при
лечении хронических заболеваний желудочно-кишечного
тракта с сопутствующим дисбактериозом кишечника
Стельмах В. В., Романцов М. Г., Сологуб Т. В.,
Шульдяков А. А., Козлов В. К., Туан Н. Х.,
Оюнгерел М., Фролов В. М.
Сравнительная эффективность этиотропной терапии
больных HBeAg-позитивным хроническим гепатитом В
(по материалам международного сравнительного плацебо
контролируемого исследования)
Малый В. П., Пенков Д. Б., Чирюкина О. И.
Циклоферон в терапии острых
и хронических форм вирусного гепатита С

Безопасность ЛС

Шаповалова О. В., Долгова Г. В.,
Неугодова Н. П., Сапожникова Г. А.
Использование органических растворителей
для определения показателя
«Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических
субстанциях, нерастворимых в воде
Васильев А. Н., Гавришина Е. В.,
Ниязов Р. Р., Снегирева А. А., Адонин В. К.
Подтверждение качества, безопасности и эффективности
биологических лекарственных препаратов
при изменении технологии их производства

Original Papers

- 3 Trenin A. S., Tsvigun E. A., Bychkova O. P., Lavrenov S. N.
Microbial Model *Halobacterium salinarum*
in Screening of Synthetic Analogues
of Antibiotic Turbomycin A with Anticancer Activity
- 8 Razumov I. A., Kazachinskaya E. I., Puchkova L. I.,
Kosogova T. A., Gorbunova I. A., Loktev V. B.,
Teplyakova T. V.
Protective Activity of Aqueous Extracts
from Higher Mushrooms Against *Herpes simplex*
Virus Type-2 on Albino Mice Model
- 13 Gostev V. V., Popenko L. N., Chernenkaya T. V.,
Naumenko Z. S., Voroshilova T. M., Zakhara Yu. A.,
Khokhlova O. E., Kruglov A. N., Ershova M. G., Angelova S. N.,
Poletaeva E. D., Molchanova I. V., Sidorenko S. V.
Estimation of MRSA Susceptibility to Oxacillin,
Cefoxitine, Vancomycin and Daptomycin

Guidelines for Practitioners

- 21 Kuznetsova T. A., Zaporozhets T. S., Besednova N. N.,
Timchenko N. F., Kryzhanovsky S. P., Golovacheva V. D.,
Zvyagintseva T. N., Shevchenko N. M.
Efficiency of a New Synbiotic Drink in Treatment
of Chronic Diseases of Gastrointestinal Tract
and Concomitant Dysbacteriosis
- 27 Stelmakh V. V., Romantsov M. G., Sologub T. V.,
Shuldyakov A. A., Kozlov V. K., Tuan N. Kh.,
Oyungerel M., Frolov V. M.
Comparative Efficacy of Etiotropic Therapy of Patients
with HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B
(by the Data of the International Comparative
Placebo-Controlled Study)
- 34 Malyy V. P., Penkov D. B., Chiryukina O. I.
Cycloferon Therapy of Acute
and Chronic Virus Hepatitis C

Drug Safety

- 41 Shapovalova O. V., Dolgova G. V.,
Neugodova N. P., Sapozhnikova G. A.
Organic Solvents for Determination
of Bacterial Endotoxin Index
in Water-Insoluble Pharmaceutical Substances
- 45 Vasiliev A. N., Gavrishina E. V.,
Niyazov R. R., Snegireva A. A., Adonin V. K.
Demonstration of Quality, Safety
and Efficacy of Biological Products Subject
to Changes in Their Manufacturing Process

По страницам журналов 56 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.

Микробная модель *Halobacterium salinarum* в отборе синтетических аналогов антибиотика турбомицина А, обладающих противоопухолевым действием

А. С. ТРЕНИН, Е. А. ЦВИГУН, О. П. БЫЧКОВА, С. Н. ЛАВРЕНОВ

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

Microbial Model *Halobacterium salinarum* in Screening of Synthetic Analogues of Antibiotic Turbomycin A with Anticancer Activity

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

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Тест-система, основанная на использовании бактериальной культуры *Halobacterium salinarum*, разработанная для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов и продемонстрировавшая ранее потенциальную возможность отбора противоопухолевых антибиотиков, оказалась эффективной в выявлении противоопухолевых соединений среди трис(1-алкилиндол-3-ил)метилиев — синтетических аналогов антибиотика турбомицина А. Изучение метансульфонатных и хлоридных солей указанной группы соединений с помощью такой тест-системы показало, что при отсутствии заметной активности у большинства испытанных веществ (МПК > 32 мкМ) ряд производных, содержащих N-бутильные и N-пентильные заместители, обладают выраженной активностью в отношении *H. salinarum*. Их МПК составила 8,0 мкМ при полном и 1,0 мкМ при частичном ингибировании роста тест-культуры. Приведённые результаты коррелируют с результатами, полученными в других исследованиях при оценке противоопухолевого действия указанных соединений с использованием опухолевых клеток. Таким образом, бактериальная тест-система *H. salinarum* показала свою перспективность в отборе соединений, обладающих противоопухолевым действием.

Ключевые слова: ингибиторы биосинтеза стеролов, антимикробные и противоопухолевые соединения, *Archaea*, *Halobacterium salinarum*, микробные модели в поиске антибиотиков, ГМГ-КоА редуктаза, ловастатин, мевалонат, соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилиев, турбомицин А.

The microbial test-system based on cultivation of *Halobacterium salinarum* developed earlier for screening inhibitors of sterol biosynthesis and proposed for screening anticancer antibiotics, proved to be efficient in revealing anticancer compounds among derivatives of tris(1-alkylindol-3-yl)methylum, synthetic analogues of antibiotic turbomycin A. Most of the methane sulfonate and chloride salts of such compounds, investigated with the help of the *H. salinarum* test-system, showed no activity (MIC > 32 mcM), while several derivatives, containing N-butyl or N-pentyl substituents were rather active against the bacterial strain. The MICs of them against *H. salinarum* were 8 mcM for total and 1 mcM for partial inhibition of the bacterial growth. The results of the study correlated with the results of other investigations that revealed anticancer activity of such compounds in tumor cell cultures. Therefore, the *H. salinarum* test-system demonstrated its availability for screening compounds with anticancer activity.

Key words: inhibitors of sterol biosynthesis, antimicrobial and anticancer compounds, *Archaea*, *Halobacterium salinarum*, microbial models for screening, HMG-CoA reductase, lovastatin, mevalonate, tris(1-alkylindol-3-yl)methylum salts, turbomycin A.

Введение

Для отбора противоопухолевых антибиотиков широко применяются различные модельные тест-системы, основанные главным образом на использовании опухолевых клеток [1–3]. Вместе с тем наличие у отдельных линий опухолевых клеток существенных различий в чувствительности к противоопухолевым препаратам, низкая чувствительность некоторых линий, а также известная сложность в их культивировании, значительно за-

трудняет их применение в качестве модельных тест-систем, в особенности при проведении масштабного скрининга противоопухолевых антибиотиков среди продуктов микробного вторичного метаболизма [4, 5]. В этом случае значительно более удобным может стать использование микробных тест-культур, менее требовательных к условиям культивирования и действию посторонних примесей, что особенно важно на начальных этапах поисковых работ при анализе грубоочищенных экстрактов, получаемых из культуральной жидкости и мицелия микробных продуцентов.

В последнее время большой интерес исследователей привлекает к себе группа археобактерий. Несо-

© Коллектив авторов, 2013

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

мненно относящиеся к прокариотному типу, клетки архебактерий, обладают многими биохимическими процессами, отличающими их от эубактерий и сближающими с высшими эукариотными организмами [6, 7]. Они могут быть применены для разработки моделей поиска биологически активных соединений. Несколько видов галофильных архебактерий, в первую очередь представители рода *Halobacterium*, являются отличными модельными организмами, используемыми для изучения многих биологических вопросов, включая поддержание структуры и репликацию хромосом, регуляцию транскрипции, экспорт и деградацию белков [7].

Предложенная тест-система, основанная на использовании бактериальной культуры *Halobacterium salinarum*, оказалась малочувствительной к микробному загрязнению. Она показала высокую эффективность в поиске ингибиторов биосинтеза стеролов [8]. Сведения, представленные в настоящем исследовании, показывают, что указанная тест-система может быть с успехом использована для отбора соединений, обладающих выраженным противоопухолевым действием.

Антибиотик турбомицин А был впервые выделен в качестве продукта микробного метаболизма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [9]. Этот антибиотик и его аналог турбомицин В удалось также получить с помощью метагеномного подхода путём клонирования в *E.coli* генетического материала, содержавшегося в образцах почвы [10–12]. В НИИНА им. Г. Ф. Гаузе этот антибиотик и его многочисленные производные получены путём полного химического синтеза [13, 14]. Ранее проведённое изучение антибиотических свойств этих соединений показало наличие у отдельных производных выраженного антибактериального и противогрибкового действия [14, 15].

В настоящем исследовании изучено действие солей производных трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия — синтетических аналогов антибиотика турбомицина А на бактериальную тест-систему *H. salinarum* [8, 16, 17]. Отдельные производные, показавшие высокую активность в отношении указанной микробной модели, были отобраны как потенциальные противоопухолевые антибиотики.

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. Получение и очистка солей трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия описаны ранее [13, 14].

Используемый в тест-системе препарат лактона D,L-мевалоновой 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.

Препаратами сравнения служили ловастатин («MSD», США) и бриллиантовый зелёный (оксалат) (ООО «Омская фармацевтическая фабрика», Россия).

Тест-система для выявления противоопухолевых соединений. Работу с бактериальной культурой *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *Halobacterium halobium* ATCC 29341) проводили, как описано ранее [8]. Для выращивания культуры *H. salinarum* использованы следующие питательные среды (в %): среда 1 (NaCl — 15,6; $MgCl_2 \times 6H_2O$ — 1,3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 2,0; $CaCl_2 \times 2H_2O$ — 0,1; KCl — 0,4; $NaHCO_3$ — 0,02; NaBr — 0,05; дрожжевой экстракт — 0,5; глюкоза — 0,1; вода — до 100; pH 7,0); среда 2 (NaCl — 25,0; $MgCl_2 \times 6H_2O$ — 2,0; $CaCl_2 \times 2H_2O$ — 0,02; KCl — 0,2; гидролизат казеина — 0,5; дрожжевой экстракт — 0,5; вода — до 100; pH 7,4); среда 3 (NaCl — 25,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,1; K_2HPO_4 — 0,1; дрожжевой экстракт — 1,0; вода — до 100; pH 7,0–7,2); среда 4 (NaCl — 18,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,1; K_2HPO_4 — 0,1; дрожжевой экстракт — 1,0; вода — до 100; pH 7,0–7,2). Плотные питательные среды содержали 2% агара.

Выращивание микробной культуры проводили в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах с круглым дном, предназначенных для проведения иммунологических реакций («Медполимер», С-Пб.). Объём питательной среды в каждой лунке (пробе) составлял 150 мкл. Инкубирование проводили в термостате при 37°C в течение 5–22 суток. Для предотвращения высыхания проб в термостате создавали условия повышенной влажности.

В качестве посевного материала использовали культуру *H. salinarum*, выращенную на агаризованных питательных средах в течение 1 недели. Клетки суспендировали в жидкой питательной среде с использованием вибратора «Вортекс ЕЛМИ» (Латвия) и разводили питательной средой до нужного объёма. Начальная оптическая плотность посевного материала, контролируемая в микрокалориметре МКМФ-1 (Россия), составляла 0,005–0,015 (в 1 см кюветах при 570 нм).

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

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

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

Оценку роста проводили фотометрически с помощью микроплетифотометра вертикального сканирования (ИФКО-2, Россия) после перемешивания содержимого лунок, а также визуально, оценивая рост клеток *H. salinarum* в виде плотного осадка красного цвета на дне лунок [8].

МПК определяли как минимальную концентрацию препарата, полностью предотвращающую рост тест-организма (МПК-1, шкала роста = 0). Для выявления тонких различий между препаратами в ряде случаев МПК оценивали как минимальную концентрацию, при которой допускался умеренный (50% от уровня контроля) (МПК-2, шкала роста = 2) рост тест-организма [18].

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 исследований

При проведении поиска биологически активных соединений с использованием тест-системы *H. salinarum* было показано, что ингибиторы био-

синтеза стеролов выявляются в ней как соединения, подавляющие рост тест-культуры. Применение мевалоновой кислоты позволяло уже на начальных этапах поиска успешно выявлять метаболиты, способные к подавлению ранних этапов биосинтеза стеролов [8, 17]. Вместе с тем модель оказалась чувствительной также к большинству противоопухолевых антибиотиков, что позволило высказать предположение о возможности её использования для отбора противоопухолевых препаратов [8]. В настоящем исследовании оценивается действие на модель *H.salinarum* новых антибиотиков — солей трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия — синтетических аналогов антибиотика турбомицина А.

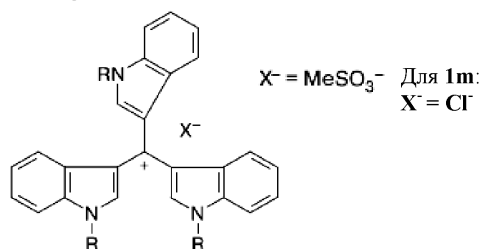
Турбомицин А состоит из трёх индольных циклов, связанных воедино центральным атомом углерода, имеющим одну незаполненную связь, что позволяет рассматривать его в качестве триарильного катиона.

В НИИНА им. Г. Ф. Гаузе получены разнообразные синтетические аналоги турбомицина

А [13]. Эти соединения, также являющиеся триарильными катионами, получены в виде стабильных солей, среди которых наилучшей растворимостью в воде обладают метансульфонаты. Степень чистоты указанных соединений превышала 95%. Необходимо было установить, обладают ли эти соединения активностью в отношении *H.salinarum*.

В экспериментах с *H.salinarum* обнаружено, что некоторые соединения обладают способностью к подавлению роста тест-культуры (таблица). Наиболее активно рост *H.salinarum* подавляли соединения **1e**, **1f**, **1g**, и **1h**. Их действие на тест-культуру было сопоставимо с действием бриллиантового зеленого и в высокой концентрации приводило к лизису клеток тест-культуры. В отличие от ловастатина, подавление роста *H.salinarum*, вызванное солями трисиндолилметилия, не снималось, а в случае соединений **1e**, **1f**, и **1g** даже несколько усиливалось в присутствии мевалоновой кислоты.

Активность солей производных трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия в отношении микробной культуры *H.salinarum* в сравнении с ловастатином и бриллиантовым зеленым



Соединение	R	Название заместителя	МПК, мкМ	
			МПК-1 ¹⁾	МПК-2 ²⁾
1a	-H	—	>64	>64
1b	-CH ₃	Метил	>64	>64
1c	-CH ₂ CH ₃	Этил	>64	>64
1d	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	<i>n</i> -Пропил	>64	32
1e	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	<i>n</i> -Бутил	8	1
1f	—CHCH ₂ CH ₃ CH ₃	<i>втор</i> -Бутил	8	1
1g	-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	<i>n</i> -Пентил	8	1
1h	—CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Изоамил	8	1
1i	-CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	<i>n</i> -Гексил	>64	32
1j	—CH ₂ -C ₆ H ₅	Бензил	>64	64
1k	-C ₁₀ H ₂₁	<i>n</i> -Децил	>64	>64
1m	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₂ CH ₃ Cl ⁻	<i>N</i> -Диметиламинопропил гидрохлорид	>64	>64
	Ловастатин		3	0,7
	Бриллиантовый зеленый		8	1

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

Активность бутильных и пентильных производных, обладающих разветвленными радикалами (соединения **1f** и **1h**), оказалась примерно на таком же высоком уровне, что и активность соответствующих им соединений, несущих неразветвленные радикалы с тем же количеством атомов углерода (C4 и C5) (соединения **1e** и **1g**).

Результаты, полученные в тест-системе *H. salinarum*, чувствительной к противоопухолевым антибиотикам, позволяют высказать предположение о том, что соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия, имеющие бутильные и пентильные радикалы (C4 и C5), обладают противоопухолевым действием. Впоследствии это предположение нашло подтверждение в экспериментах с культурами опухолевых клеток *in vitro*.

Обсуждение результатов

Действие производных трисиндолилметилия было изучено в других работах с использованием различных линий опухолевых клеток [13, 14]. Обнаружилось, что цитотоксичность солей трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия в отношении опухолевых клеток зависит от длины заместителя при атоме азота гетероцикла и возрастает от незамещенного по атому азота производного (соединение **1a**, аналог антибиотика турбомицина А) до N-бутил- и N-пентилпроизводных (соединения **1e** и **1g**). Дальнейшее увеличение длины N-алкильного заместителя приводило к уменьшению цитотоксичности. При этом соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия оказались значительно менее токсичными в отношении использованных линий неопухолевых клеток (лимфоциты здоровых доноров и клеточной линии эндотелия сосудов мыши SVEC-4-10), чем в отношении опухолевых клеток. В экспериментах на мышах показано противоопухолевое действие соединения **1g** *in vivo* [13, 14].

Можно высказать предположение, что механизм гибели опухолевых клеток под воздействием солей трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия связан с процессами апоптоза. Наиболее активные соединения **1e** и **1g** в концентрации 1 мкМ вызывали апоптоз примерно половины опухолевых клеток линии Jurkat в культуре. В аналогичных условиях трис(1-бензилиндол-3-ил)метилий (соединение **1j**) вызывал апоптотическую гибель свыше 80% клеток. Под действием соединения **1g** отмечены характерные для апоптоза нарушения целостности ДНК, в частности деградация клеточных ядер [14].

Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия проявили также способность к воздействию на гетеродимерный белок NFκB, вовлеченный в регуляцию апоптоза. Как известно, в активированном состоянии этот белок транслоцируется в ядро, где активирует транскрипцию различных генов, в том числе ингибиторов апоптоза. Выяснилось,

что соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия, в частности соединения **1e** и **1g**, использованные в нетоксических концентрациях, значительно снижают уровень субъединицы p65 белка NFκB, способствуя тем самым развитию апоптоза и гибели опухолевых клеток [14].

Таким образом, было выявлено противоопухолевое действие солей трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия, предсказанное на основании результатов их изучения в бактериальном тесте *H. salinarum*, а указанная микробная модель, в свою очередь, подтвердила свою способность к выявлению не только ингибиторов биосинтеза стеролов, но и противоопухолевых антибиотиков. При этом закономерность в изменении активности в зависимости от длины радикала в отношении опухолевых клеток в целом совпадала с той зависимостью, которая наблюдалась при изучении действия солей трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия на грибные и бактериальные культуры [14, 15], что, по-видимому, свидетельствует об общности механизмов цитотоксичности этих соединений для клеток про- и эукариотов.

Тот факт, что соединения, несущие разветвленные бутильные и пентильные радикалы (соединения **1f** и **1h**), обладают не менее высокой активностью в отношении *H. salinarum*, чем соединения с неразветвленными радикалами (**1e** и **1g**), позволяет высказать предположение о том, что они также могут обладать противоопухолевой активностью. Такие соединения нуждаются в дальнейшей проверке и детальном изучении с применением культур опухолевых клеток.

Несомненно, археобактерии (Archaea) являются уникальной группой микроорганизмов. Способные к росту в экстремальных условиях внешней среды, в условиях повышенной концентрации соли, они встречаются всюду, где оказываются подходящими температура, pH и концентрация NaCl: в природных солёных водоёмах, бассейнах для выпаривания соли, белковых материалах, консервируемых с помощью соли (рыба, мясо, шкуры) и т. д. Их сходство по многим параметрам с высшими эукариотными организмами несомненно вызывает повышенный интерес [6, 7].

Синтез липидов, осуществляемый галобактериями по мевалонатному, а не по более обычному для бактерий малонатному пути, позволяет рассматривать культуру *H. salinarum* в качестве уникальной и вместе с тем весьма удобной биологической модели, предоставляющей хорошую возможность проведения поиска микробных метаболитов — ингибиторов биосинтеза стеролов и параллельного изучения действия препаратов, способных к подавлению ГМГ-КоА редуктазы [8, 16, 19, 20].

Отличие белков галобактерий от белков негалофильных организмов, связанное с высоким содержанием кислотных остатков и низким содер-

жанием основных, приводит к резкому снижению изоэлектрической точки белков и, как результат, к их адаптации к высокой концентрации соли, что позволяет при исследовании белков галобактерий лучше понять функционирование соответствующих им белков млекопитающих [7].

Важной отличительной особенностью галобактерий является также то, что их клеточные стенки не содержат диаминопимелиновой и муравьей кислот, а состоят главным образом из липопротеида. Таким образом, клеточная стенка галобактерий, представляющая собой поверхностный монослой (S-слой), сформированный из идентичных гексагональных гликопротеиновых субъединиц, имеет белковую природу [21].

При биосинтезе S-слоя те модификации, которым подвергается первоначально синтезируемый незрелый предшественник (в первую очередь изопренилирование), происходят только после транслокации белка через плазматическую мембрану. Этот факт позволяет провести чёткую па-

раллель с эукариотическими клетками, где липидная модификация белков происходит также после их транслокации через мембрану эндоплазматического ретикулума [22–24]. Приведённые факты, совместно с результатами, представленными в предыдущих работах [8, 25], а также в настоящем исследовании относительно чувствительности *H. salinarum* к соединениям, обладающим противоопухолевым действием, заставляют думать о существовании возможного сходства галобактерий с опухолевыми клетками.

Заключение

Таким образом, полученные данные ярко демонстрируют потенциальные возможности модели *H. salinarum* в оценке биологически активных соединений, а также целесообразность её применения в дальнейшем поиске антибиотиков, имеющих различный механизм действия, в том числе соединений, обладающих противоопухолевой активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сазыкин Ю.О., Бибикина М.В., Иванов В.П. и др. Технология скрининга вторичных микробных метаболитов: к эволюции методологии. Антибиотики и химиотер 2002; 47: 10: 25–31.
2. Koehn F.E. High impact technologies for natural products screening. Prog. Drug Res 2008; 65: 177–210.
3. Zanella F., Lorens J.B., Link W. High content screening: seeing is believing. Trends Biotechnol 2010; 28: 5: 237–245.
4. Braña M.F., Sánchez-Migallón A. Anticancer drug discovery and pharmaceutical chemistry: a history. Clin. Transl. Oncol 2006; 8: 10: 717–728.
5. Sharma S.V., Haber D.A., Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. Nat Rev Cancer 2010; 10: 4: 241–253.
6. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 2: 504–544.
7. Soppa J. From genomes to function: *Haloarchaea* as model organisms. Microbiology 2006; 152: 3: 585–590.
8. Тренин А.С. Микробная модель *Halobacterium salinarum* для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 5–6: 3–10.
9. Budzikiewicz H., Eckau H., Ehrenberg M. Bis (3-indolyl)-3H-indolyliden-methan, ein von *Saccharomyces cerevisiae* Gebildeter Farbstoff. Tetrahedron Lett 1972; 36: 3807–3810.
10. Gillespie D.E., Brady S.F., Bettermann A.D. et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 9: 4301–4306.
11. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68: 4: 669–685.
12. Brady S.F., Simmons L., Kim J.H., Schmidt E.W. Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. Nat Prod Rep 2009; 26: 11: 1488–1503.
13. Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E. et al. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl)methylum salts: role of N-alkyl substituents. Bioorg Med Chem 2010; 18: 18: 6905–6913.
14. Степанова Е.В., Штиль А.А., Лавренов С.Н. и др. Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия — новый класс противоопухолевых соединений. Извест Акад наук. Сер хим 2010; 12: 1–9.
15. Тренин А.С., Лавренов С.Н., Преображенская М.Н. Фунгицидное действие новых производных трииндолилметана: роль п-алкильных заместителей в проявлении активности препаратов. Иммунопатология, аллергология, инфектология. Труды междисциплинар. форума: Новые антимикотики и перспективные фунгициды. 2010; 1: 229.
16. Тренин А.С., Цвицун Е.А., Терехова Л.П. и др. Микробные модели в поиске ингибиторов биосинтеза атеросклероза. Тез. докл. I Всероссийск. конференции по проблемам атеросклероза. М.: 1999; 167.
17. Тренин А.С. Микробные модели для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 7–8: 3–11.
18. Wayne P. A. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard. NCCLS Document M38-A. NCCLS. ISBN 1-56238-470-8.
19. Cabrera J.A., Bolds J., Shields P.E. et al. Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A concentration in response to mevalonate availability. J Biol Chem 1986; 261: 8: 3578–3583.
20. Fitch M.E., Mangels A.R., Altmann W.A. et al. Microbiological screening of mevalonate-suppressive minor plant constituents. J Agric Food Chem 1989; 37: 687–691.
21. Jarrell K.F., Jones G.M., Kandiba L. et al. S-Layer glycoproteins and flagellins: reporters of archaeal posttranslational modifications. Archaea. 2010. Jul 20. Published online. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913515>.
22. Eichler J. Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco)proteins. Microbiology 2003; 149: 12: 3347–3351.
23. Eichler J., Adams M.W. Posttranslational protein modification in Archaea. Microbiol Mol Biol Rev 2005; 69: 3: 393–425.
24. Eichler J., Maupin-Furlow J., Soppa J. Archaeal protein biogenesis: posttranslational modification and degradation. Archaea. 2010. Sep 30. pii: 643046. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2948886>.
25. Sioud M., Baldacci G., Forterre P., de Recondo A.M. Antitumor drugs inhibit the growth of halophilic archaeobacteria. Eur J Biochem 1987; 169: 2: 231–236.

Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей

И. А. РАЗУМОВ^{1,2}, Е. И. КАЗАЧИНСКАЯ², Л. И. ПУЧКОВА²,
Т. А. КОСОГОВА², И. А. ГОРБУНОВА³, В. Б. ЛОКТЕВ², Т. В. ТЕПЛЯКОВА²

¹ Институт цитологии и генетики, СО РАН, Новосибирск

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область

³ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

Protective Activity of Aqueous Extracts from Higher Mushrooms Against *Herpes simplex* Virus Type-2 on Albino Mice Model

I. A. RAZUMOV, E. I. KAZACHINSKAYA, L. I. PUCHKOVA,
T. A. KOSOGOVA, I. A. GORBUNOVA, V. B. LOKTEV, T. V. TEPLYAKOVA

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Novosibirsk Region, Koltsovo

Central Siberian Botanical Gardens, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Проведено изучение токсичности и противовирусной активности водных экстрактов, приготовленных из высших грибов, базидиомицетов: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler — шиитаке, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. — вешенка устричная, *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát — чага, *Hydnellum compactum* (Pers.) P. Karst. — ежевик плотный. Экстракты не обладали острой токсичностью для мышей в дозах от 0,8 до 4 мг на животное при пероральном и внутривентральном введении. При повышении дозы сухого вещества экстракта чаги до 20 мг на мышью наблюдалась гибель половины животных. При внутривентральном введении водных экстрактов грибов 0,4–2 мг сухого вещества на мышью за сутки до заражения животных одной ЛД₅₀ вируса простого герпеса 2 типа была выявлена 100% выживаемость животных, получивших экстракты грибов *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus*, и 90% выживаемость при использовании экстрактов *Inonotus obliquus* и *Hydnellum compactum*.

Ключевые слова: базидиальные грибы, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Inonotus obliquus*, *Hydnellum compactum*, водные экстракты, противовирусная активность *in vivo*, вирус простого герпеса 2 типа.

Toxicity and antiviral activity of aqueous extracts from higher mushrooms such as *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (oyster), *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát (chaga), *Hydnellum compactum* (Pers.) P. Karst. (compact tooth) were studied. In doses of 0.8 to 4.0 mg (dry weight) per mouse administered orally or intraperitoneally the extracts showed no acute toxicity. When the dose of the chaga extract was increased to 20 mg per mouse, a half of the animals died. Intraperitoneal administration of the aqueous extracts in a dose of 0.4–2 mg per mouse prior to the contamination by a single LD₅₀ of *Herpes simplex* type 2 provided 100-percent survival of the animals exposed to the *Lentinula edodes* or *Pleurotus ostreatus* extracts and 90-percent survival of the animals exposed to the *Inonotus obliquus* or *Hydnellum compactum* extracts.

Key words: basidiomycetes, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Inonotus obliquus*, *Hydnellum compactum*, aqueous extracts, *in vivo* antiviral activity, *Herpes simplex* type 2.

Введение

Вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) является членом подсемейства *Alphaherpesvirinae* семейства *Herpesviridae* [1]. Геном представлен двухцепочечной ДНК размером более 154 тысяч нуклеотидов, которая кодирует 77 полипептидов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10301>). ВПГ-2 наиболее часто вызывает генитальную герпетическую инфекцию [2, 3]. Заболевание ге-

нитальным герпесом в разных странах достигает уровня в 80–200 случаев на 100 тыс. населения [4]. Для пациентов с иммунодефицитными состояниями ВПГ-2 представляет особую опасность, вызывая генерализованную герпетическую инфекцию с обширными поражениями внутренних органов, нередко с летальным исходом.

Для лечения герпесвирусных инфекций используется целый ряд противовирусных препаратов. Наиболее часто применяется препарат ацикловир (зовиракс, виroleкс), являющийся синтетическим аналогом дезоксигуанидина. После фосфорилирования он способен блокировать

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции:

E-mail: earumov@bionet.nsc.ru

Таблица 1. Характеристики экстрактов из грибов базидиомицетов

Вид, штамм гриба	Происхождение биомассы для экстрактов	Способ приготовления образца	Масса сухого вещества, мг/мл
<i>Lentinula edodes</i> 3760 (шиитакэ)	Мицелий, выращенный на зерне в течение 1 мес	Навеску гриба с сырым зерном суспендировали в стерильной дистиллированной воде 1:4 по массе, прогревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, фильтровали через несколько слоев марли, а затем центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	4,0
<i>Inonotus obliquus</i> (чага)	Чага сухая из аптеки (поставщик ООО «Лека-Трест», г. Барнаул)	5 г измельчённой на кофемолке чаги залили 100 мл кипящей воды, выдерживали 1 ч на качалке при комнатной температуре, затем 3 суток в термостате при температуре 50°C, отфильтровали через марлю, затем центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	20,0
<i>Hydnellum compactum</i> KL-9 (ежовик плотный)	Плодовые тела (собранные в Караканском бору, Новосибирской обл.)	10 г высушенных, измельчённых на кофемолке плодовых тел залили 200 мл кипящей дистиллированной воды, встряхивали на качалке при температуре 28–30°C в течение 1 ч при 120 об/мин, затем выдерживали 2 суток в термостате при 50°C, профильтровали через 8 слоев марли, центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	5,5
<i>Pleurotus ostreatus</i> НК-35 (вешенка устричная)	Мицелий, выращенный на зерне в течение 1 мес	Навеску гриба с сырым зерном суспендировали в стерильной дистиллированной воде 1:4 по массе, прогревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем выдерживали 48 ч при 50°C в термостате, центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	4,0

вирусную ДНК полимеразу и синтез вирусной ДНК [5]. Клеточные синтезы при этом блокируются незначительно. Его широкое использование привело к возникновению лекарственно-устойчивых штаммов вируса герпеса. Токсичность ацикловира также накладывает ограничения к его применению у пациентов с нарушениями функции почек. В медицинской практике для лечения герпесвирусных инфекций также используются идоксуридин, фоскарнет, тромантадин, интерфероны и их индукторы, а также препараты растительного происхождения, например, панавир [6]. Однако существующие лекарственные средства на основе ацикловира, а также другие противовирусные препараты химического и растительного происхождения, не позволяют эффективно контролировать герпесвирусные инфекции [4]. Это ставит перед исследователями задачу поиска и разработки новых противовирусных препаратов как химического, так и растительного происхождения.

Нами ранее была показана противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов, для культур клеток инфицированных ВПГ-2 [7]. Было обнаружено, что ряд препаратов, полученных из грибов, относящихся к родам *Ganoderma*, *Lentinula* и *Pleurotus*, полностью подавляли инфекционную активность ВПГ-2 на культуре клеток Vero. Противовирусная активность этих препаратов была связана, по-видимому, с наличием в их составе полисахаридов.

Целью данной работы явилось получение экстрактов из высших грибов базидиомицетов:

Lentinula edodes, *Pleurotus ostreatus*, *Inonotus obliquus*, *Hydnellum compactum* и изучение токсичности и протективной активности этих экстрактов для белых мышей, инфицированных ВПГ-2.

Материал и методы

Объекты исследования и их культивирование и приготовление. В работе были использованы экстракты из базидиальных грибов: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (= *Lentinus edodes* (Berk.) Singer) — шиитакэ, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. — вешенка устричная, *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát — чага, *Hydnellum compactum* (Pers.) P. Karst. — ежовик плотный, имеющиеся в лаборатории микологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор»). Для подготовки экстрактов или образцов использовали биомассу грибов, полученную путём выращивания их на стерильном зерне [8], некоторые из образцов были представлены плодовыми телами. Более полные данные по образцам представлены в табл. 1.

Вирусы. Штамм MS вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) был получен из Американской коллекции клеточных культур (ATCC). В ГНЦ ВБ «Вектор» вирусный штамм прошёл 1 пассаж на культуре клеток Vero. До начала работ исходную суспензию, содержащую вирус, хранили в жидком азоте.

Культура клеток. Перевиваемую культуру клеток Vero (почки африканской зелёной мартышки) поддерживали на питательной среде DMEM (ГНЦ ВБ «Вектор»), содержащей 5% сыворотки плода коровы («BioClot», Германия).

Мыши. Опыты по определению токсичности и протективной активности образцов проводили на белых беспородных мышках 3–4-недельного возраста, полученных из вивария ГНЦ ВБ «Вектор».

Определение токсичности проб. Для выявления токсичности образцы объёмом 100 и 500 мкл/мышь вводили внутрибрюшинно или перорально (*per os*) дважды с интервалом в трое суток. Срок наблюдения за животными составил 2 недели.

Таблица 2. Протективная активность водных экстрактов грибов у белых мышей, инфицированных вирусом простого герпеса 2 типа

Экстракт гриба	Количество сухого вещества, введённого в животное, мг	Число инфицированных мышей	Число выживших мышей, %
<i>Lentinula edodes</i> (шиитакэ)	0,4	10	10 (100)
<i>Inonotus obliquus</i> (чага)	2	10	9 (90)
<i>Hydnellum compactum</i> (ежовик плотный)	0,55	10	9 (90)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (вешенка устричная)	0,4	10	10 (100)
Физиологический раствор	0	10	5 (50)

Примечание. Мышей инфицировали одной ЛД₅₀ ВПГ-2. ТГ-2. За животными наблюдали в течение 26 сут после инфицирования. Объём препарата на мышь – 100 мкл.

Определение протективной активности образцов. Защитное действие экспериментальных препаратов изучали при их введении по 100 мкл/мышь внутрибрюшинно за сутки до инфицирования мышей ВПГ-2 в дозе, вызывающей 50% гибель инфицированных животных. Срок наблюдения составил 26 дней. Изучение антивирусной активности грибных проб проводили, руководствуясь методами, представленными в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [9] и Государственной Фармакопеи [10].

Результаты и обсуждение

Определение токсичности образцов на животных. Определение токсичности водных экстрактов грибов *Lentinula edodes*, *Inonotus obliquus*, *Hydnellum compactum*, *Pleurotus ostreatus* проводилось с использованием белых беспородных мышей при пероральном и внутрибрюшинном введении экстрактов. В диапазоне доз от 0,8 до 5,5 мг (из расчёта на суммарное сухое вещество экстракта) острой токсичности водных экстрактов четырёх видов грибов выявлено не было. При использовании экстракта гриба чаги была предпринята попытка определить нижнюю границу токсичности подобных препаратов. В результате было обнаружено, что острая токсичность проявляется при парентеральном введении 20 мг разведённого сухого вещества этого препарата на каждое животное. В результате инокуляции такой дозы погибла половина животных.

Определение протективной активности образцов. Протективную активность водных экстрактов грибов определяли в соответствии с рекомендациями [11] при использовании внутрибрюшинного способа введения водных экстрактов за 24 ч до инфицирования животных ВПГ-2 (табл. 2). При введении водных экстрактов грибов видов *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus* в дозе 0,4 мг сухого вещества на мышь за сутки до заражения животных одной ЛД₅₀ (летальная доза вируса, вызывающая гибель 50% животных при введении) вируса простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) была выявлена 100 % выживаемость животных и 90% у обработанных экстрактами грибов видов *Inonotus obliquus* и *Hydnellum compactum* в дозе 2 и 0,55 мг сухого вещества на мышь соответственно.

Итак, установлено, что введение препаратов для защиты от экспериментальной герпесвирус-

ной инфекции обеспечивает 100% выживаемость белых мышей, обработанных водными экстрактами грибов *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus*.

Препараты водных экстрактов *Inonotus obliquus* и *Hydnellum compactum* показали несколько меньшую, но весьма существенную протективную активность.

Антивирусная активность экстрактов базидиальных грибов описана в отношении вируса гепатита В [12], вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1) и вируса гриппа А [13, 14], вируса иммунодефицита человека, ортопоксвирусов [15, 16], а также некоторых других вирусов [17–19]. Так, рядом авторов было показано, что препараты, приготовленные из гриба *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, достоверно ингибировали цитопатический эффект вируса простого герпеса и вируса везикулярного стоматита на культуре клеток [20, 21]. Основными компонентами этих препаратов являются различные полисахариды (40,6%) и белки (7,8%). Из культуры гриба *Macrocystidia cucumis* (Pers.) Joss, был выделен пуриновый нуклеозид, который обладал антивирусной активностью против ВПГ-1 на культуре клеток в концентрациях 300–440 мкг/мл с индексом селективности более 22 [22]. Был обнаружен синергический эффект при совместном использовании этого препарата с ацикловиром и видарабином. Из водного экстракта гриба *Rozites caperatus* (Pers.: Fr) P. Karst были выделены новые антивирусные препараты RC28 и RC183 белковой природы, препятствующее процессу репликации ВПГ 1 и 2 типов, цитомегаловирусов, респираторно-синцитиального вируса и вируса гриппа типа А [23]. Другими авторами был обнаружен протеин, обладающий антивирусной активностью в отношении вирусов герпеса и гепатита [24, 25]. Гликопротеин, выделенный из мицелия *G. lucidum* также был эффективен против ВПГ 1 и 2 типа [26]. Из экстракта плодового тела гриба *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray было выделено соединение белковой природы, ингибирующее репликацию ВПГ-1. В результате анализа химического состава соединения антивирусного белка с помощью метода

масс-спектрометрии было найдено, что это пептид, состоящий из 11 аминокислот [24, 25]. Большую группу биологически активных соединений грибов составляют изопреноиды. При анализе противовирусной активности экстракта *Ganoderma pfeifferi* Bres. против вируса гриппа типа А и вируса простого герпеса 1 типа было установлено, что основным противовирусным компонентом экстракта были тритерпеноиды: ганодермадиол, луцидодиол, апланоксиновая кислота G [27]. Недавно было выявлено, что противовирусной активностью в отношении вирусов герпеса обладают полисахариды гриба *Agaricus brasiliensis* Fr. и гликаны из *Pleurotus tuber-regium* (*Lentinus tuber-regium* (Fr.) Fr.) [28, 29]. Полученные результаты указывают, что препараты на основе базидиальных грибов, как правило, проявляют активность при низких концентрациях активного вещества и обладают низкой токсичностью. Кроме того, по-видимому, противовирусное действие *in vitro* веществ в составе грибных препаратов связано с неспецифическим реагированием их со свободными вирионами. Эти вещества или субстанции после инкубации *in vitro* с вирусом и последующим заражении клеток взаимодействуют с мембранами клеток и конкурируют с вирусами за рецепторы или полисахариды на поверхности клеток, с помощью которых происходит прикрепление и проникновение вируса внутрь клетки-хозяина. А при обработке клеток до инфицирования вирусом эти субстанции блокируют клеточные рецепторы для проникновения вируса, а после инфицирования не позволяют вирусному потомству выходить из заражённых клеток и далее инфицировать соседние здоровые клетки.

Нами ранее была показана противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из грибов, относящихся к родам *Ganoderma*, *Lentinus* и *Pleurotus*, для клеток культуры Vero, инфицированных ВПГ-2 [7]. Нами было высказано предположение, что противовирусная активность этих препаратов была связана с непосредственным взаимодействием полисахаридов с вирусными частицами.

Возможность защиты животных от вирусной инфекции подобными препаратами далеко не очевидна. Поэтому были предприняты эксперименты по оценке возможной острой токсичности водных экстрактов, приготовленных из грибов родов *Lentinula*, *Pleurotus*, *Inonotus* и *Hydnellum*, для беспородных белых мышей при двух способах введения препаратов. Все исследованные препараты не проявляли острой токсичности при пероральном и парентеральном

введении в дозах от 0,8 до 5,5 мг на животное. Попытка достичь порога токсичности была предпринята только для препарата из гриба чаги при внутрибрюшинном введении. Оказалось, что острая токсичность проявляется при концентрациях порядка 20 мг/мл сухого вещества. Вполне понятно, что это весьма высокие концентрации сухого вещества для простых водных экстрактов и на практике они весьма труднодостижимы без использования специальных способов экстракции.

Невысокая токсичность позволила нам провести оценку способности водных экстрактов, приготовленных из грибов базидиомицетов, защищать от гибели белых мышей от летальной инфекции, вызванной введением ВПГ-2. Полученные результаты подтвердили выявленную на клетках Vero противовирусную активность грибных экстрактов. Протективная или защитная активность водных экстрактов из базидиомицетов *Lentinula edodes* (шиитаке), *Pleurotus ostreatus* (вешенка устричная), *Inonotus obliquus* (чага), *Hydnellum compactum* (ежовик плотный) при экспериментальной герпесвирусной инфекции у мышей не была показана ранее. Наличие выраженного противовирусного эффекта в экспериментах *in vitro* и *in vivo* указывает на перспективность использования водных экстрактов для создания относительно простых противовирусных препаратов. Важно отметить, что противовирусная активность водных экстрактов грибов против вируса простого герпеса может позволить сконструировать технологически простые препараты для лечения поверхностных герпетических поражений. Другая возможность связана с поиском и выделением противовирусных веществ или соединений из водных экстрактов высших грибов. Перспективность этого направления несомненна, и она обосновывается выраженной протективной активностью исследованных экстрактов и их низкой токсичностью. Это может позволить не только проводить поиск препаратов для лечения вирусных заболеваний, но и разрабатывать лекарственные средства для комплексной терапии, что особенно важно при вирусных заболеваниях, так как они зачастую осложняются сочетанными инфекциями.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ, интеграционным проектом СО РАН № 52, грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-65387.2010.4 и НШ-2996.2012.4, договором Минобрнауки № 11.G34.31.0034.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. et al. Fields virology. Publisher: Philadelphia :Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
2. Weiss H. Epidemiology of *Herpes simplex* virus type 2 infection in the developing world. *Herpes* 2004; 11: Supp 1: 1: 24A—35A.
3. Malkin J.E. Epidemiology of genital *Herpes simplex* virus infection in developed countries. *Herpes* 2004; 11:Supp 1: 1: 2A—23A.
4. Джонс Ш., Каннинхэм А. Вакцинопрофилактика генитального и неонатального герпеса, вызванного вирусом простого герпеса. *Инфекц перед пол пут* 2004; 1: 46–49.
5. Faulds D., Heel R.C. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs* 1990; 39: 597–638.
6. Кузнецова Т.В., Герасимова Н.М., Кунгуров Н.В. Опыт применения препарата панавир при лечении больных генитальной герпесвирусной инфекцией. *Вестн последиплом мед обр* 2002; 3—4: 14—16.
7. Разумов И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И., Щербакоева Н.С., Горбунова И.А., Михайловская И.Н., Локтев В.Б., Теплякова Т.В. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. *Антибиотики и химиотер* 2010; 55: 9—10: 14—18.
8. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: 1988; 144.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: 2000; 1—398.
10. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. М.: 1990; 11: 2: 2: 187—209.
11. Бурова Л.Г., Евстропов А.Н., Грек О.Р., Захарова Л.Н. Волхонская Т.А. Применение полифенольного комплекса экстрагированного из пятилистника кустарникового (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O.Schwarz) для профилактики Коксаки-вирусной инфекции. *Бюлл сибир мед* 2002; 4: 27—31.
12. Gao Y., Zhou Sh., Huang M., Xu A. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (*Aphyllaphoromycetideae*): a review. *Int J Med Mushrooms* 2003; 5: 235—246.
13. Niedermeyer T.H., Lindequist U., Mentel R., Gördes D., Schmidt E., Thuro K., Falk M. Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *J Nat Prod.* 2005; 68: 12: 1728—1731.
14. Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A., Mazurkova N.A., Khanin V.A., Vlasenko V.A. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai mountains (Russia). *Intern J Med Mush* 2012; 14: 1: 37—45.
15. Гашикова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Сергеев А.Н. Результаты исследований по выявлению анти-ВИЧ активности экстрактов из высших базидиальных грибов. *Иммунопатол аллергол инфектол* 2009; 2: 170—171.
16. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов. *Проблем особо опас инфекц* 2012; 3: 113: 99—101.
17. Wasser S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 89: 5: 1323—1332.
18. Stamets P. MycoMedicinals. An informational treatise on mushrooms. Olympia, WA: Myco Media Productions 2002; 96.
19. Brandt C.R., Pirano F. Mushroom antiviral. *Recent Res Dev Antimicrob Agent Chemother* 2000; 4: 11—26.
20. Eo S.-K., Kim Y.-S., Lee C.-K., Han S.-S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 1: 1—3: 175—181.
21. Eo S.-K., Kim Y.-S., Lee C.-K., Han S.-S. Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from *Ganoderma lucidum* II. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 1: 1—3: 129—136.
22. Oh K.-W., Lee C.-K., Kim Y.-S., Eo S.-K., Han S.-S. Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and vidarabine. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 1: 1—2: 221—227.
23. Pirano F. F. The Development of the Antiviral Drug RC 28 from *Rozites caperatus* (Pers.: Fr.) P. Karst. (*Agaricomycetideae*). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2005; 7: 356.
24. Gu C., Li J., Chao F., Jin M., Wang X., Shen Z. Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa*. *Antivir Res* 2007; 75: 250—257.
25. Gu C., Li J., Chao F. Inhibition of hepatitis B virus by D-fraction from *Grifola frondosa*: Synergistic effect of combination with interferon- α in HepG2 2.2.15. *Antivir Res* 2006; 72: 162—165.
26. Eo S.-K., Kim Y.-S., Lee C.-K., Han S.-S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 1—3: 175—181.
27. Mothana R.A.A., Awadh Ali N.A., Jansen R., Wegner U., Mentel R., Lindequist U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia* 2003; 74: 177–180.
28. Cardozo F.T., Camellini C.M., Mascarello A., Rossi M.J., Nunes R.J., Barardi C.R., de Mendonça M.M., Simões C.M. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antivir Res* 2011; 92: 1: 108—114.
29. Zhang M., Cheung P. C., Ooi V. E., Zhang L. Evaluation of sulfated fungal beta-glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydr Res* 2004; 339: 13: 2297—3001.

Оценка чувствительности MRSA к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину

В. В. ГОСТЕВ¹, Л. Н. ПОПЕНКО², Т. В. ЧЕРНЕНЬКАЯ³, З. С. НАУМЕНКО⁴, Т. М. ВОРОШИЛОВА⁵,
Ю. А. ЗАХАРОВА⁶, О. Е. ХОХЛОВА⁷, А. Н. КРУГЛОВ⁸, М. Г. ЕРШОВА⁹, С. Н. АНГЕЛОВА⁹,
Е. Д. ПОЛЕТАЕВА⁹, И. В. МОЛЧАНОВА¹⁰, С. В. СИДОРЕНКО¹

¹ ФГБУ «НИИ детских инфекций ФМБА России», Санкт-Петербург

² НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург

³ НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

⁴ ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздрава России, Курган

⁵ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург

⁶ ФГБУЗ «Пермский клинический центр» ФМБА России, Пермь

⁷ ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск

⁸ ООО «Национальное агентство по клинической фармакологии и фармации», Москва

⁹ ГУЗ ЯО Инфекционная клиническая больница №1, Ярославль

¹⁰ ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск

Estimation of MRSA Susceptibility to Oxacillin, Cefoxitine, Vancomycin and Daptomycin

V. V. GOSTEV, L. N. POPENKO, T. V. CHERNENKAYA, Z. S. NAUMENKO, T. M. VOROSHILOVA, YU. A. ZAKHAROVA,
O. E. KHOKHLOVA, A. N. KRUGLOV, M. G. ERSHOVA, S. N. ANGELOVA, E. D. POLETAEVA,
I. V. MOLCHANOVA, S. V. SIDORENKO

Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Service, St. Petersburg

N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Service, Moscow

G. A. Ilizarov Russian Research Centre of Restorative Traumatology and Orthopedics, Kurgan

A. M. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg

Perm Clinical Centre, Perm

V. F. Voino-Yasenevskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk

National Agency of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow

Infectious Clinical Hospital No. 1, Yaroslavl

Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk

Распространение и терапия инфекций, вызываемых метициллинорезистентными золотистыми стафилококками (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA), остается одной из серьезнейших проблем в мире. В связи с этим очень важным является правильная лабораторная идентификация фенотипа MRSA, основанная на использовании маркерного антибиотика — цефокситина, чувствительность которого выше, чем оксациллина. Тенденцией последних лет является появление штаммов со сниженной чувствительностью к препаратам «последней линии защиты» от MRSA: ванкомицину и даптомицину. В России не изучена чувствительность MRSA к этим препаратам, и отсутствуют данные о распространении VISA (vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*) и hVISA (hetero-VISA) фенотипов. В настоящей работе представлены результаты оценки чувствительности 316 изолятов MRSA, собранных в нескольких регионах страны к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину. Так, установлено, что диапазон минимальной подавляющей концентрации (МПК) оксациллина лежит в очень широких пределах: 0,5–512 мкг/мл, при этом 2,2±1% штаммов фенотипически проявляют чувствительность к оксациллину, несмотря на наличие гена *mecA*. Напротив, к цефокситину эти изоляты MRSA проявляли выраженный уровень устойчивости, МПК>16 мкг/мл. По результатам серийных микроразведений выявлено, что 30,7±7% штаммов имеют критический уровень чувствительности с МПК 2 мкг/мл к ванкомицину, а при использовании Е-тестов выявлено 1,3±1% штаммов с МПК, равным 2–4 мкг/мл. MRSA проявляли высокую степень чувствительности к даптомицину, однако 2,8±1% штаммов характеризовались высокими значениями МПК (2 мкг/мл). Более того, в работе отмечено перекрестное снижение чувствительности к ванкомицину и даптомицину.

Ключевые слова: метициллинорезистентные стафилококки (MRSA), оксациллин, цефокситин, ванкомицин, даптомицин.

Prevalence and therapy of infections due to MRSA remain one of the most serious problems in the world. Therefore, correct laboratory identification of the MRSA phenotype based on the use of the marker antibiotic cefoxitine, as a more susceptible one vs. oxacillin, is of great importance. There is lately being observed a tendency towards emergence of strains with lower susceptibility

to the last reserve drugs protecting from MRSA, i. e. vancomycin and daptomycin. Susceptibility of MRSA to these drugs was not investigated in Russia and there are no data on the prevalence of the VISA and hVISA phenotypes. The results of our study on estimation of susceptibility of 316

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. НИИ детских инфекций

MRSA isolates from several regions of Russia to oxacillin, ceftazidime, vancomycin and daptomycin are presented herein. It was shown that the ranges of the oxacillin MIC were extremely wide, i. e. 0.5 to 512 mcg/ml, while $2.2 \pm 1\%$ of the isolates was susceptible by the phenotype to oxacillin, in spite of the *mecA* gene presence. As for ceftazidime, the MRSA isolates were rather resistant to it at the MIC > 16 mcg/ml. The tests with serial microdilutions revealed that $30.7 \pm 7\%$ of the isolates had a critical level of susceptibility to vancomycin at the MIC 2 mcg/ml. The E-tests revealed $1.3 \pm 1\%$ of the isolates which were susceptible at the MIC 2–4 mcg/ml. The MRSA isolates were highly susceptible to daptomycin, while high levels of the MIC (2 mcg/ml) were characteristic of $2.8 \pm 1\%$ of the isolates. Cross reduction of the susceptibility to vancomycin and daptomycin was observed.

Key words: methicillin resistant staphylococci (MRSA), oxacillin, ceftazidime, vancomycin, daptomycin.

Введение

Дифференцировка метициллиночувствительных и метициллинорезистентных золотистых стафилококков (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA) имеет принципиальное значение для терапии, так как последние проявляют клиническую устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, за счёт наличия дополнительного пенициллинсвязывающего белка PBP2a, кодируемого геном *mecA*, и отличающегося сниженной аффинностью ко всем антибиотикам этой группы. При этом считается, что MRSA проявляют устойчивость ко всем бета-лактамам, несмотря на существенные различия в аффинности PBP2a к отдельным бета-лактамам [1, 2]. Гетерорезистентность популяции некоторых изолятов MRSA по чувствительности к оксациллину значительно осложняет лабораторную детекцию метициллинорезистентности [2]. Последний факт послужил основанием для замены оксациллина на цефокситин в качестве препарата для скрининга клинических изолятов *S. aureus* на метициллинорезистентность и признанию молекулярных методов детекции *mecA* гена в качестве золотого стандарта. Большинство изолятов MRSA также демонстрируют ассоциированную устойчивость к другим классам антибиотиков, именно поэтому препаратом выбора для лечения соответствующих инфекций долгое время оставался ванкомицин.

Однако с середины 1990 годов, сначала в Японии и США, а затем и по всему миру, стали появляться сообщения о штаммах со сниженной чувствительностью к ванкомицину. В настоящее время выделяют VISA (vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*), hVISA (hetero VISA) и VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) изоляты. VRSA отличаются высоким уровнем устойчивости (МПК ванкомицина более 64 мкг/мл), такие варианты формируются крайне редко (в мире описано менее 20 изолятов) в результате приобретения стафилококками детерминант резистентности от энтерококков [3]. VISA и hVISA изоляты отличаются невысокими уровнями МПК (4–8 и 2–4 мкг/мл соответственно) [4] и общим механизмом формирования устойчивости — усилением синтеза пептидогликана. При этом для hVISA характерна гетерогенность устойчивости к ванко-

мицину — повышенные значения МПК проявляет лишь незначительная часть популяции (около 1% клеток). Выявить VISA и hVISA изоляты с помощью диско-диффузионного метода невозможно. «Золотой стандарт» детекции VISA и hVISA изолятов — популяционный анализ, который весьма трудоёмок и требует специального оборудования [5]. При инфекциях, вызываемых как VISA, так и hVISA изолятами, отмечают значительное снижение эффективности ванкомицина. Более того, риск неудачи лечения возрастает уже при МПК ванкомицина более 1 мкг/мл, хотя по критериям как EUCAST, так и CLSI такие изоляты ещё рассматривают как чувствительные [6, 7].

Возрастание этиологической значимости инфекций, вызванных грамположительными бактериями, а также недостатки ванкомицина стимулировали разработку и внедрение в медицинскую практику во второй половине XX века новых препаратов соответствующей направленности. К таким препаратам относится даптомицин, разработанный ещё в 1980 годах, но одобренный FDA для использования только в 2003 году [8]. Даптомицин — антибиотик из класса липопептидов, обладающий новым механизмом действия, однако уже через несколько лет после его внедрения в клиническую практику были описаны первые клинические изоляты со сниженной чувствительностью с МПК ≥ 2 мкг/мл. Одним из крайне неблагоприятных факторов также является возможное перекрёстное снижение чувствительности к ванкомицину и даптомицину [9].

Целью настоящей работы были оценка распространённости среди MRSA изолятов типа VISA/hVISA, а также сравнительная оценка активности ванкомицина и даптомицина.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. В работу включены 316 изолятов MRSA, выделенных от больных с разными формами внутрибольничных и внебольничных инфекций. Штаммы были собраны в 2011–2012 гг. из стационаров Санкт — Петербурга, Москвы, Ярославля, Перми, Челябинска, Кургана, Красноярска.

Идентификация культур, оценка антибиотикочувствительности. Идентификацию культур *Staphylococcus aureus* проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений с определением МПК в бульоне Cation-Adjusted Mueller Hinton II Broth (BD,

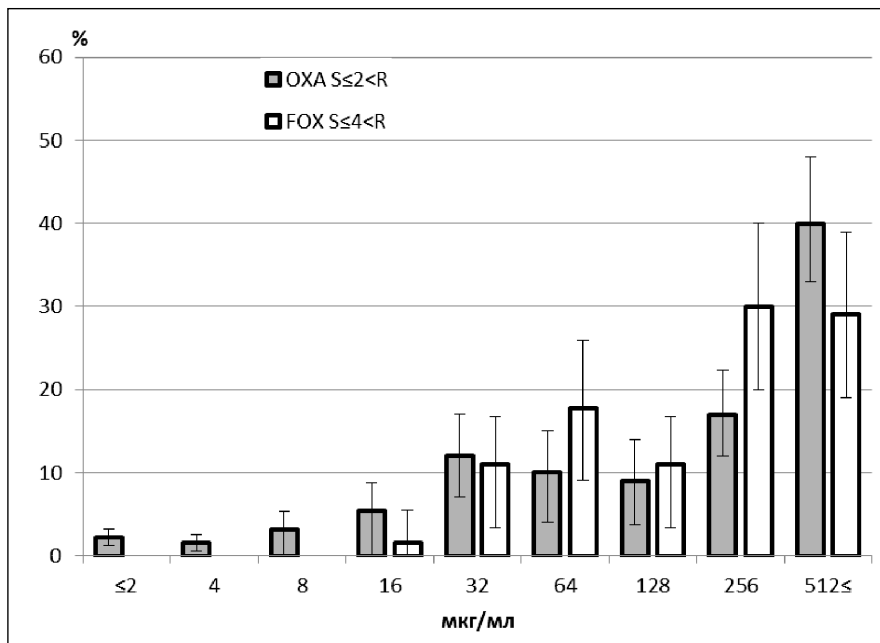


Рис. 1. Распределение МПК к оксациллину и цефокситину у изученных штаммов MRSA.

США). Были использованы субстанции оксациллина и цефокситина (Sigma, США). Для оценки чувствительности к ванкомицину и даптомицину использовали готовые планшеты Sensititre в бульоне CAMH — TES buffer (TREK Diagnostic Systems, США). Дополнительно у 73 штаммов определяли МПК к ванкомицину с использованием эпсилометрических тестов двух производителей (M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd и Etest®, BioMérieux, Франция) на агаре Мюллера-Хинтона (BioMérieux, Франция). Постановку эпсилометрических тестов осуществляли в двух вариантах: с бактериальной взвесью 0,5 и 2 по стандарту мутности Мак-Фарланд (McF), результаты учитывали через 24 и 48 ч. Определение МПК и интерпретацию результатов проводили в соответствии с CLSI 2011-2012. В качестве контрольных штаммов были использованы *S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* Mu50 (МПК ванкомицина 4—8 мкг/мл), клинический изолят hVISA 2533/00 (МПК 2—4 мкг/мл).

Выявление гена *tesA* в ПЦР. Выделение тотальной бактериальной ДНК проводили с помощью наборов «ДНК-сорб Б» («АмплиСенс», Россия). Для ПЦР детекции гена *tesA* были выбраны олигонуклеотиды F: 5'-AAGTTTGCCATAAGATCTATAA-3', R: 5'-ATTTATGTATGGCATGAGTAA-3', размер ампликона 672 п.н. (праймеры синтезированы в ЗАО «Евроген», Россия). ПЦР проводили с реакционными смесями HS-ScreenMix («Евроген», Россия) в 25 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» (Россия) по следующему протоколу: предварительная денатурация: 95°C — 5 мин, далее 32 цикла: 95°C — 10 с, 50°C — 10 с, 72°C — 20 с., финальная элонгация при 72°C — 5 мин.

Анализ и статистическая обработка данных. Описательная статистика — результаты представлены в виде долей с 99% доверительным интервалом, для сравнения методов определения МПК в серийных микроразведениях и эпсилометрических тестах использована модель Блэнда-Алмана [10]. Расчёт МПК и других показателей, проводили на платформе WHONET ver. 5.6.

Результаты и обсуждение

Все изоляты ($n=316$), включённые в исследование, были идентифицированы как *S.aureus* со

средним коэффициентом идентификации (MALDI Biotyper score) $2,2 \pm 1,5$ и давали положительный результат в ПЦР на наличие гена *tesA*.

Оксациллин и цефокситин.

Результаты оценки чувствительности изолятов MRSA к оксациллину и цефокситину приведены на рис. 1. Диапазон МПК к оксациллину оказался очень широким и составил 0,5—512 мкг/мл, МПК₉₀ 512, средняя геометрическая (СГ) — 130 мкг/мл. Как можно заметить (см. рис.1), несмотря на наличие *tesA*, некоторые штаммы ($2,2 \pm 1\%$) проявляли фенотипическую чувствительность с МПК ≤ 2 мкг/мл. Помимо этого, можно также выделить ещё два кластера изолятов: это MRSA с высокими значениями

МПК (256—512 мкг/мл) и большая группа с разбросом от 4 до 128 мкг/мл. Из многих исследований известно, что MRSA характеризуются вариабельностью в отношении чувствительности к оксациллину, а МПК может колебаться от 2 до 1000 мкг/мл [11]. Такой разброс является следствием наличия гетерорезистентных популяций, где частота появления клеток с высокими МПК составляет всего 10^{-7} и ниже [2, 12]. Ещё один фактор, это различное строение стафилококковых *tes*-кассет (SCC_{tes}). В работе [13] мы уже отмечали связь между типом SCC_{tes} и уровнем устойчивости к оксациллину. Более того, в последнее время увеличивается число сообщений о фенотипически чувствительных к оксациллину MRSA, несущих ген *tesA* [14]. В нашем исследовании при использовании цефокситина все MRSA имели МПК ≥ 16 мкг/мл и среднегеометрическая МПК составила 170 мкг/мл, а МПК₉₀ — 512 мкг/мл, также не было обнаружено изолятов с МПК, близкой к пограничной зоне (4 мкг/мл). Тем не менее картина неравномерной чувствительности к цефокситину также сохраняется. Несмотря на то что $2,2 \pm 1\%$ MRSA оказались «чувствительными» к оксациллину, клинически беталактамы антибиотики будут неэффективны, поскольку в опытах *in vitro* установлено, что при культивировании таких клеток в присутствии оксациллина уже через несколько часов МПК возрастает в несколько раз [15].

Ванкомицин и даптомицин. По результатам серийных разведений диапазон значений МПК ванкомицина был в пределах 0,06—2 мкг/мл, СГ составила 1,2 мкг/мл и МПК₉₀ 2 мкг/мл. Распределение МПК было следующим: $0,3 \pm 0,3\%$ изоля-

тов с МПК 0,06 мкг/мл; $2,2 \pm 1\%$ с МПК 0,5 мкг/мл; $66,7 \pm 9\%$ с МПК 1 мкг/мл. Однако обращает на себя внимание, что $30,7 \pm 7\%$ изолятов имеют пограничное значение — 2 мкг/мл, что по современным критериям CLSI, EUCAST расценивается как чувствительность. Несмотря на это, как указывалось ранее, при МПК > 1 мкг/мл вероятность неудачной терапии ванкомицином возрастает. Следовательно, изоляты, имеющие МПК 2 мкг/мл, следует рассматривать как штаммы «группы риска». Для выявления и подтверждения hVISA/VISA фенотипов рекомендуется использовать одновременно несколько методик. В серийных разведениях МПК может быть занижена (в среднем на одно разведение), а также этот метод не позволяет выявлять фенотипическую гетерогенность. С другой стороны, использование эсипометрических тестов решает эту проблему, но наоборот, может приводить к завышенным результатам [16, 17].

В данной работе параллельно для оценки чувствительности были использованы эсипометрические тесты с обычной и высокой бактериальной нагрузкой. Так, МПК₉₀ и среднегеометрическая МПК соответственно составили: в эсипометрических тестах с 0,5 McF — 2 и 1,19 мкг/мл (диапазон 0,25—3,5 мкг/мл); эсипометрических тестах с 2 McF — 3 и 1,7 мкг/мл (диапазон 0,5—4 мкг/мл).

Для более детальной оценки трёх методов измерений была использована модель Блэнда — Алтмана, основанная на отношении средней (μ) данных, полученных в сравниваемых методах, и разницы в измерениях в рамках двух стандартных отклонений ($\pm 2\sigma$). На рисунке 2, а представлена модель сравнения серийных разведений и эсипометрического теста с 0,5 McF. Следует обратить внимание, что 90% всех точек лежат в пределах допустимых границ $\mu \pm 2\sigma$, то есть в рамках $(-0,1) \pm 1,6$ мкг/мл, средняя разность между измерениями составила всего -0,1 мкг/мл со стандартным отклонением 0,8, что говорит о небольших различиях в измерениях. Напротив,

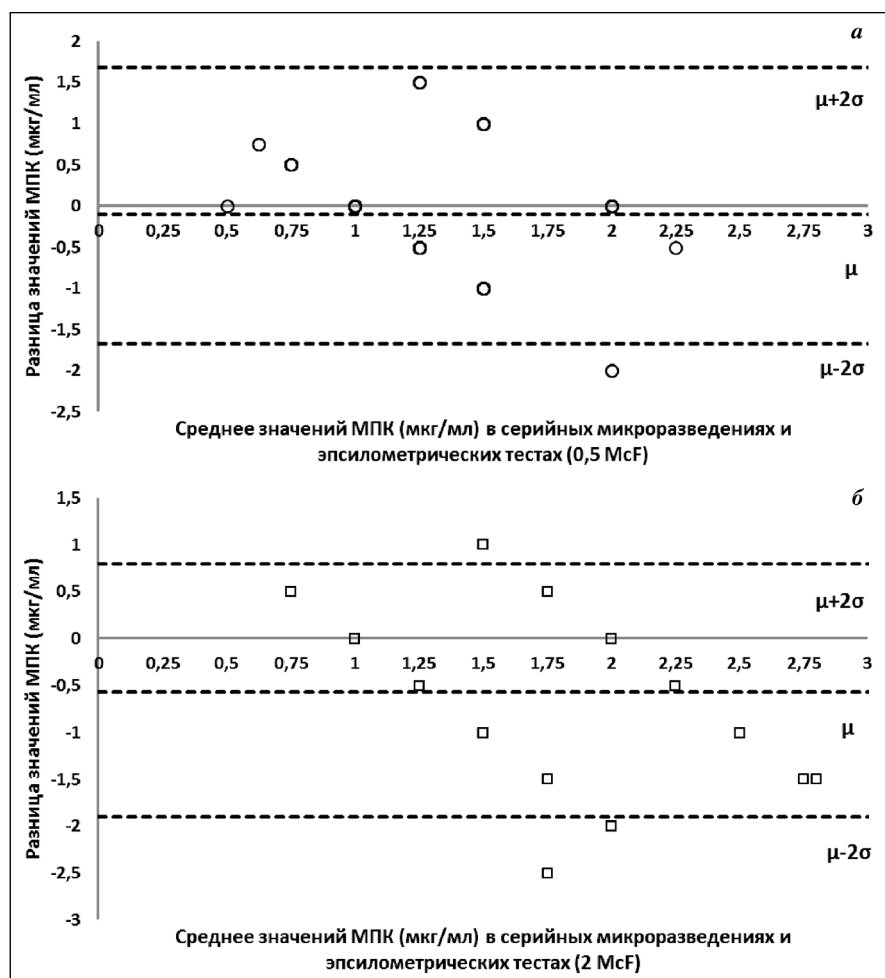


Рис. 2. Модель Блэнда — Алтмана для сравнения двух методик.

а — серийные микроразведения и Е-тесты с 0,5 McF; б — серийные микроразведения и эсипометрические тесты с 2 McF. По вертикали — разброс значений разности МПК в сравниваемых методах; по горизонтали — разброс значений средней в двух методах измерений. Пунктирные линии: (μ) — средняя разностей всех измерений; ($\mu \pm 2\sigma$) — допустимые границы в разнице измерений.

сравнивая результаты серийных разведений и Е-тестов с 2 McF (рис. 2, б), мы получаем видимую высокую среднюю разность, которая составляет -0,6 мкг/мл при небольших диапазонах измерений МПК: 0,5—3,5 мкг/мл. Большое количество точек ложится в зоне высоких значений МПК — до 2,5 мкг/мл, хотя 80% результатов находятся в рамках допустимых границ $(-0,6) \pm 1,36$ мкг/мл. 20% точек, выходящих за пределы $\mu \pm 2\sigma$, можно расценивать как ошибку измерений с учётом высокой бактериальной нагрузки.

Для 4 из 73 изолятов ($5 \pm 4\%$ и $1,3 \pm 1\%$ от всей выборки), имеющих МПК 2 мкг/мл в серийных разведениях, были характерны высокие значения МПК при использовании эсипометрических тестов, которые составили 3 мкг/мл в 0,5 McF (рис. 3, а) и 4 мкг/мл в 2 McF (рис. 3, б). Таким образом, такие изоляты можно рассматривать как hVISA варианты. Контрольные штаммы Mu50 (рис. 4, а) и hVISA 2533/00 (рис. 4, б),

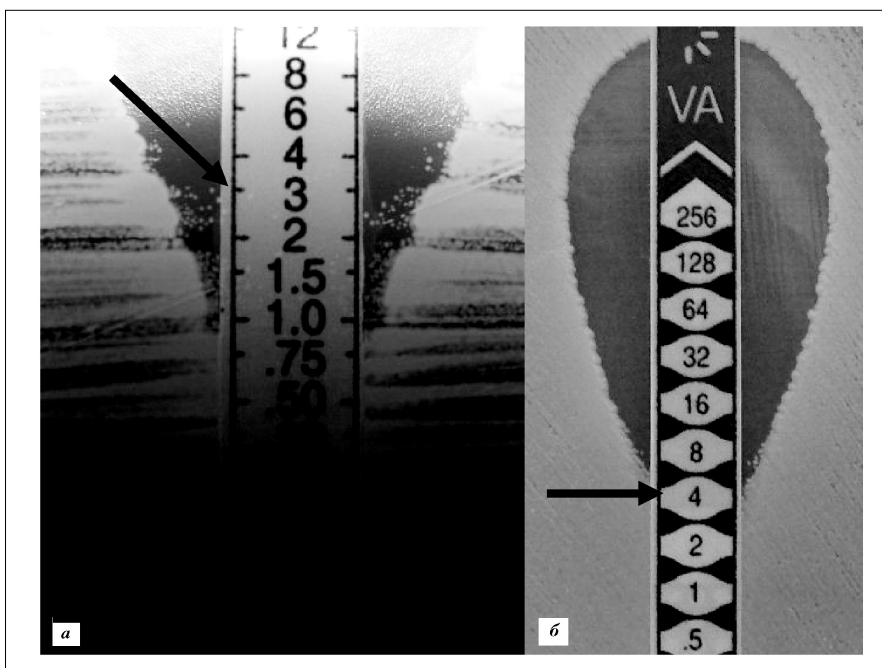


Рис. 3. Эпсилومترические тесты с клиническими изолятами hVISA. Значения МПК отмечены черными стрелками.

a — изолят SA0085, (Etest®, BioMérieux, Франция) МПК 3 мкг/мл (0,5 McF); *б* — изолят SA0080, (M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd) МПК 4 мкг/мл (2 McF).

соответственно имели МПК 4–8 мкг/мл и 2–4 мкг/мл. К сожалению, использование эпсилومترических тестов с 2 McF не позволяет достоверно выявлять hVISA фенотип, поскольку само увеличение бактериальной нагрузки ведет за собой и увеличение МПК. При использовании эпсилومترических тестов раз-

диапазоне 0,38–0,75 мкг/мл [19]. Противоположные результаты представлены в исследовании А. С. Musta с соавт. [6], где среди 489 MRSA, выделенных от больных с бактериемией в разные периоды с 1996 по 2006 гг., выявлено 10% изолятов с МПК 2 мкг/мл, из которых порядка 30% характеризовались как hVISA фенотипы. В многоцентро-

личных производителей были получены сходные результаты. Необходимо отметить, что при оценке результатов следует учитывать рост единичных колоний в пределах зон ингибции роста.

Данные о частоте распространения hVISA и VISA вариантов в мире противоречивы. Так, в исследовании А. М. Pitz с соавт. [18], проведенном в одном стационаре за девятилетний период (2000–2008 гг.), было выявлено всего 17% MRSA с МПК ≥ 2 мкг/мл к ванкомицину и только 2 изолята обладали hVISA фенотипом. Другие авторы отмечают крайне низкую частоту встречаемости hVISA/VISA. Например, в работе R. L. Holmes, J. H. Jorgensen было исследовано 240 изолятов MRSA, выделенных от больных с сепсисом за период 1999–2006 гг., МПК ванкомицина была в

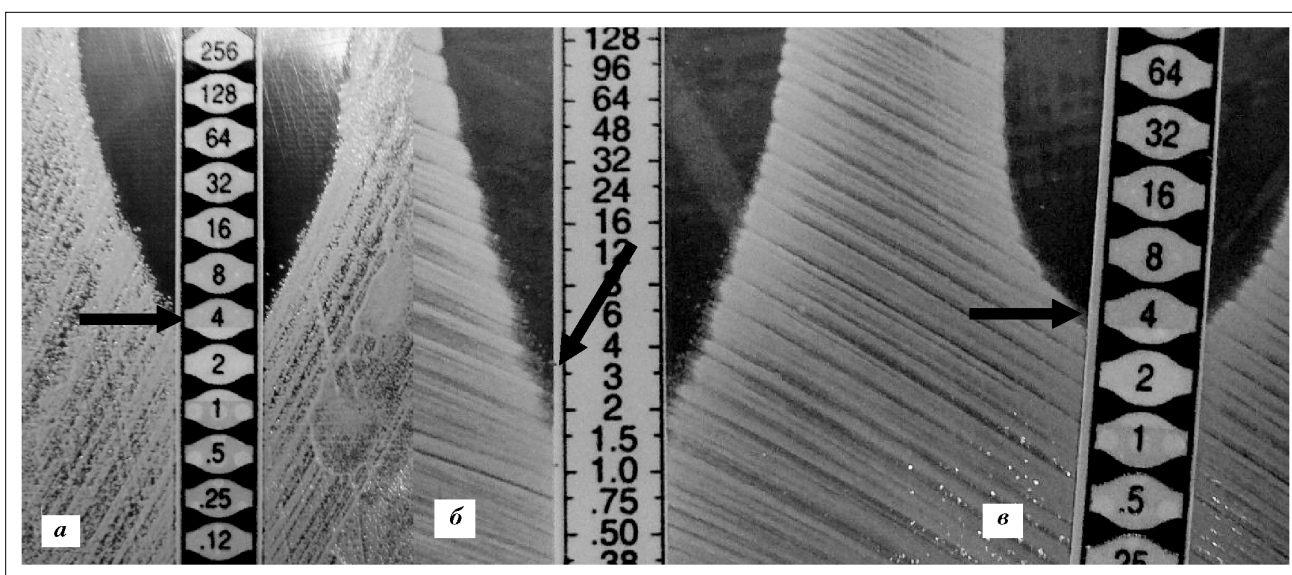


Рис. 4. Эпсилومترические тесты с контрольными штаммами. Значения МПК отмечены черными стрелками.

a — VISA Mu50, M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd (МПК 4 мкг/мл); *б* — hVISA 2533/00 Etest®, BioMérieux, Франция (МПК 3 мкг/мл), 0,5 McF; *в* — hVISA 2533/00 M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd (МПК 4 мкг/мл), 0,5 McF.

вом исследовании, проведённом в Канаде, из 6414 изолятов MRSA, собранных с 1995—2006 гг., только 4% имели МПК 2 мкг/мл, а общее количество hVISA составило 5,3% [20]. На протяжении последнего десятилетия всё больше появлялось сообщений о hVISA изолятах. По данным некоторых авторов, частота выявления таких стафилококков в конкретных медицинских учреждениях очень высокая [4, 21, 22]. Такой разброс данных является следствием отсутствия унифицированного метода определения hVISA, а также нестабильности фенотипов.

Чувствительность MRSA к даптомицину. Диапазон МПК даптомицина в отношении исследуемых изолятов составил 0,03—2 мкг/мл, среднегеометрическая МПК 0,8 мкг/мл. Распределение МПК носило следующий характер: 0,3±0,3% изолятов с МПК 0,03 мкг/мл; 0,6±1% с МПК 0,25 мкг/мл; 39,5±8% с МПК 0,5 мкг/мл и 56,6±9% с МПК 1 мкг/мл. В нашей работе выявлено 9 штаммов (2,8±1%), не чувствительных к даптомицину и имеющих МПК 2 мкг/мл. Если проанализировать проведённые исследования по изучению чувствительности стафилококков к даптомицину, то можно сделать вывод, что частота встречаемости изолятов с МПК ≥ 2 мкг/мл крайне не велика. Так, в работе [23], где тестировались изоляты, собранные ещё в 2001 году, до внедрения в практику антибиотика в Европе, среди 334 MRSA диапазон МПК составил 0,12—1 мкг/мл, МПК₉₀ 0,5 мкг/мл, нечувствительных стафилококков описано не было. В другом исследовании, проведённом в США, из 1800 изолятов MRSA, выделенных от больных с сепсисом в 2001—2006 годах, только 0,1% имели МПК 1,5 мкг/мл [24, 25]. Из анализа более чем 3000 штаммов стафилококков, собранных в начале 2000 годов в Европе, Северной и Южной Америки, только 0,06% изолятов имели МПК ≥ 2 мкг/мл [26]. Хотя, в последнее время всё чаще появляются единичные сообщения об изолятах со сниженной чувствительностью к даптомицину. Полученные в нашем исследовании данные, говорят о достаточно высокой доле MRSA (2,8±1%), имеющих МПК 2 мкг/мл, такие штаммы требуют генетической расшифровки механизмов, обуславливающих повышение МПК.

Другая немаловажная проблема — это перекрёстное снижение чувствительности MRSA к

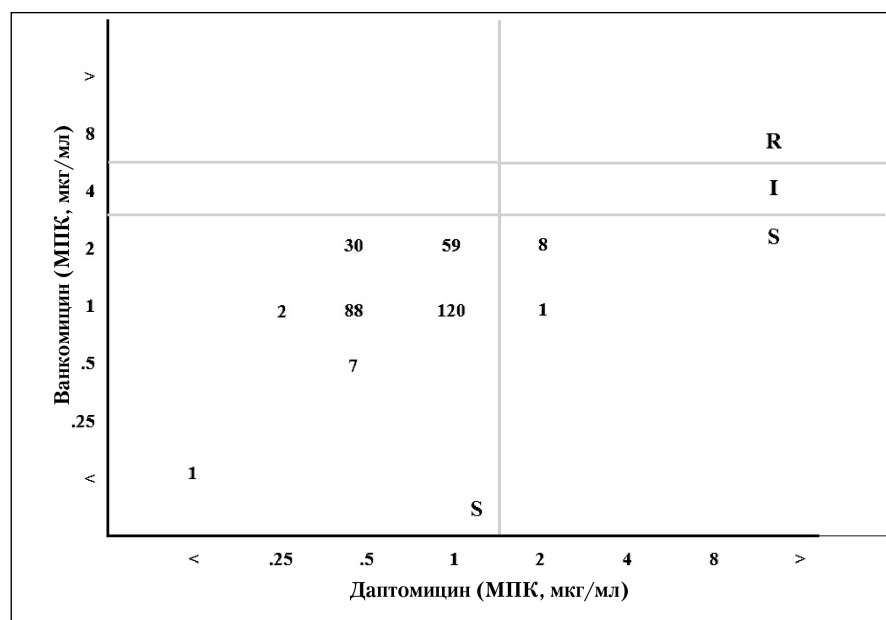


Рис. 5. Распределение МПК к ванкомицину и даптомицину (скаттерграмма) у MRSA, представлены абсолютные данные (n=316).

гликопептидам и даптомицину. В работах [9, 27, 28] продемонстрировано, что снижение чувствительности MRSA к ванкомицину может коррелировать с повышением МПК к даптомицину до 2 мкг/мл у hVISA, и до 4 мкг/мл у VISA. Также имеются данные о возможном параллельном снижении чувствительности к рассматриваемым антибиотикам у пациентов, находящихся на терапии этими препаратами [28, 29]. В нашем исследовании параллельный анализ чувствительности к ванкомицину и даптомицину (рис. 5) показал, что подавляющее большинство изолятов имеют фенотипы с МПК 1 мкг/мл к обоим антибиотикам. В отношении подавляющего большинства штаммов с МПК 2 мкг/мл к ванкомицину, МПК даптомицина колеблется в пределах 0,5—1 мкг/мл. Однако, 8 штаммов с «критическим» значением МПК ванкомицина были нечувствительны к даптомицину (МПК 2 мкг/мл). Среди них отдельного внимания заслуживает изолят SA0077, выделенный из мокроты от больного с пневмонией и абсцессом лёгкого, который находился на терапии ванкомицином. При постановке серийных разведений были получены следующие результаты: МПК даптомицина составила 4 мкг/мл, ванкомицина — 2 мкг/мл. Однако при повторном определении МПК к ванкомицину и даптомицину составила 2 мкг/мл.

Как уже отмечалось, проблема перекрёстного снижения чувствительности к ванкомицину и даптомицину описывается во многих работах [9, 27, 28], однако механизм такого явления до конца остается невыясненным. У не чувствительных к этим антибиотикам штаммов MRSA, описывают-

ся мутации в регулонах, участвующих в регуляции и биосинтезе клеточной стенки, что способствует увеличению её толщины и изменению химического состава [30, 31]. Кроме того, механизм резистентности к даптомицину связан, в первую очередь, с накоплением мутаций и изменением паттернов экспрессии генов, участвующих в биосинтезе мембранных фосфолипидов, результатом этого является изменение суммарного заряда цитоплазматической мембраны [31]. Эти изменения ведут к неспособности молекулы даптомицина электрохимически взаимодействовать с мембранной. Еще одной особенностью hVISA/VISA вариантов и не чувствительных к даптомицину изолятов, является крайне неустойчивый фенотип, который может реверсировать в чувствительные формы в лабораторных условиях.

Заключение

Таким образом, анализируя чувствительность изолятов MRSA к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину, можно отметить некоторые особенности. Уровень резистентности MRSA к оксациллину отличается широким диапазоном, при этом $2,2 \pm 1\%$ *mecA*-положительных MRSA оценены как чувствительные. В этой связи рекомендуемым маркерным антибиотиком для детекции фенотипа MRSA является цефокситин, все штаммы к этому антибиотику имели МПК ≥ 16 мкг/мл. Наиболее серьезная проблема обстоит с определением чувствительности к ванкомицину, поскольку диско-диффузионный метод не приемлем для выявления hVISA/VISA, а методов количественной оценки МПК существует множество вариантов, но к сожалению, ни один из них

не обладает высокой степенью эффективности и воспроизводимости. Использование эспилометрических тестов частично решает такую проблему за счёт выявления фенотипической гетерогенности, однако существует вероятность получения завышенных результатов МПК, и в частности с увеличением бактериальной нагрузки, что было продемонстрировано в настоящей работе. Усугубляет ситуацию также неустойчивость фенотипов со сниженной чувствительностью к ванкомицину в лабораторных условиях. Другая немаловажная проблема — это высокая доля MRSA ($30,7 \pm 7\%$) с «критическими» значениями МПК 2 мкг/мл. Фенотип hVISA был выявлен у четырёх изолятов, для которых было характерно появление зон роста на уровне МПК 2–4 мкг/мл в эспилометрических тестах. Конечно, выявленные в Российских регионах hVISA изоляты, требуют детального анализа механизмов резистентности. В исследовании также показано, что снижение чувствительности к ванкомицину влияет и на повышение МПК к даптомицину, количество штаммов с МПК 2 мкг/мл к ванкомицину и даптомицину составило $2,5 \pm 1\%$. Достаточно высокая доля изолятов MRSA с МПК 2 мкг/мл к даптомицину, требует детальной расшифровки механизмов, обуславливающих снижение чувствительности к этому препарату.

Выражаем благодарность члену-корреспонденту РАМН, д. б. н., профессору А. А. Фирсову (НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва), и профессору Гриневич (Варшава) за предоставленные штаммы *S.aureus* Mu50 и hVISA 2533/00.

ЛИТЕРАТУРА

- Chambers H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 4: 781–791.
- Ikonidis A., Michail G., Vasdeki A., Labrou M., Karavasilis V., Stathopoulos C., Maniatis A.N., Pournaras S. In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 11: 3905–3908.
- Perichon B., Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 11: 4580–4587.
- Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D., Stinear T.P., Grayson M.L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 1: 99–139.
- Walsh T.R., Bolmstrom A., Qvarnstrom A., Ho P., Wootton M., Howe R.A., MacGowan A.P., Diekema D. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001; 39: 7: 2439–2444.
- Musta A.C., Riederer K., Shemes S., Chase P., Jose J., Johnson L.B., Khatib R. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years. J Clin Microbiol 2009; 47: 6: 1640–1644.
- Wi Y.M., Kim J.M., Joo E.J., Ha Y.E., Kang C.I., Ko K.S., Chung D.R., Song J.H., Peck K.R. High vancomycin minimum inhibitory concentration is a predictor of mortality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. Int J Antimicrob Agents 2012; 40: 2: 108–113.
- Steenbergen J.N., Alder J., Thorne G.M., Tally F.P. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 3: 283–288.
- Kelley P.G., Gao W., Ward P.B., Howden B.P. Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): implications for therapy after vancomycin treatment failure. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 5: 1057–1060.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: 1999.
- Figueiredo A.M., Ha E., Kreiswirth B.N., de Lencastre H., Noel G.J., Senterfit L., Tomasz A. In vivo stability of heterogeneous expression classes in clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. J Infect Dis 1991; 164: 5: 883–887.
- Tomasz A., Nachman S., Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1: 124–129.
- Гостев В.В., Сидоренко С.В. Тип стафилококковой хромосомной *mec*-кассеты (SCC*mec*) и уровень резистентности метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* к оксациллину. Проблем мед микол 2012; 14: 2: 77–78.
- Saeed K., Dryden M., Parnaby R. Oxacillin-susceptible MRSA, the emerging MRSA clone in the UK? J Hosp Infect 2010; 76: 3: 267–268.
- Sakoulas G., Gold H.S., Venkataraman L., DeGirolami P.C., Eliopoulos G.M., Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001; 39: 11: 3946–3951.

16. Nadarajah R., Post L.R., Liu C., Miller S.A., Sahm D.F., Brooks G.F. Detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* with the updated Trek-Sensititre System and the MicroScan System. Comparison with results from the conventional Etest and CLSI standardized MIC methods. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 6: 844–848.
17. Satola S.W., Farley M.M., Anderson K.F., Patel J.B. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1: 177–183.
18. Pitz A.M., Yu F., Hermesen E.D., Rupp M.E., Fey P.D., Olsen K.M. Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin-resistant *S.aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1: 269–274.
19. Holmes R.L., Jorgensen J.H. Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2: 757–760.
20. Adam H.J., Louie L., Watt C., Gravel D., Bryce E., Loeb M., Matlow A., McGeer A., Mulvey M.R., Simor A.E. Detection and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates in Canada: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1995–2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2: 945–949.
21. Khosrovaneh A., Riederer K., Saeed S., Tabriz M.S., Shah A.R., Hanna M.M., Sharma M., Johnson L.B., Fakih M.G., Khatib R. Frequency of reduced vancomycin susceptibility and heterogeneous subpopulation in persistent or recurrent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 9: 1328–1330.
22. Wootton M., MacGowan A.P., Walsh T.R., Howe R.A. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2: 329–332.
23. Critchley I.A., Draghi D.C., Sahm D.F., Thornsberry C., Jones M.E., Karlowsky J.A. Activity of daptomycin against susceptible and multidrug-resistant Gram-positive pathogens collected in the SECURE study (Europe) during 2000–2001. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 3: 639–649.
24. Sader H.S., Fey P.D., Limaye A.P., Madinger N., Pankey G., Rahal J., Rybak M.J., Snyderman D.R., Steed L.L., Waites K. et al. Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 10: 4127–4132.
25. Sader H.S., Rhomberg P.R., Jones R.N. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 7: 3162–3165.
26. Streit J.M., Jones R.N., Sader H.S. Daptomycin activity and spectrum: a worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 4: 669–674.
27. van Hal S.J., Paterson D.L., Gosbell I.B. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient — a review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 5: 603–610.
28. Kirby A., Edwards C., Broughton C.M., Williams N.J. Glycopeptide and daptomycin resistance in community-associated MRSA in the UK. *Infection* 2011; 39: 3: 277–279.
29. Skiest D.J. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2: 655–656.
30. Fischer A., Yang S.J., Bayer A.S., Vaezzadeh A.R., Herzig S., Stenz L., Girard M., Sakoulas G., Scherl A., Yeaman M.R. et al. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 8: 1696–1711.
31. Peleg A.Y., Miyakis S., Ward D.V., Earl A.M., Rubio A., Cameron D.R., Pillai S., Moellering R.C., Eliopoulos G.M. Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2012; 7: 1: e28316.

Эффективность нового синбиотического напитка при лечении хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта с сопутствующим дисбактериозом кишечника

Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, Н. Ф. ТИМЧЕНКО¹,
С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ², В. Д. ГОЛОВАЧЕВА³, Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА⁴, Н. М. ШЕВЧЕНКО⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» СО РАМН, Владивосток

² Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток

³ Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

⁴ ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Efficiency of a New Synbiotic Drink in Treatment of Chronic Diseases of Gastrointestinal Tract and Concomitant Dysbacteriosis

T. A. KUZNETSOVA, T. S. ZAPOROZHETS, N. N. BESEDNOVA, N. F. TIMCHENKO, S. P. KRYZHANOVSKY,
V. D. GOLOVACHEVA, T. N. ZVYAGINTSEVA, N. M. SHEVCHENKO

Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok
Far East Federal University, Vladivostok

Medical Association, Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

Проведено рандомизированное исследование эффективности нового синбиотического напитка при включении его в комплекс терапии пациентов с хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта и сопутствующим дисбактериозом кишечника. Синбиотический напиток содержит пробиотический штамм бифидобактерий и полисахариды из бурой водоросли *Fucus evanescens* с пребиотической активностью и широким спектром биологического действия на организм. Лечение с применением синбиотического напитка сопровождалось более выраженной редукцией клинических симптомов, более эффективным восстановлением микрофлоры кишечника, более высоким процентом излеченности по сравнению с курсом традиционной терапии и терапии с включением кисломолочного бифидобактерина.

Ключевые слова: дисбактериоз, синбиотики, полисахариды из бурых водорослей, фукоидан, альгинат, функциональные пищевые продукты.

The efficacy of a novel synbiotic drink in the complex therapy of patients with chronic diseases of the gastrointestinal tract and concomitant intestinal dysbacteriosis was investigated in a randomized trial. The synbiotic drink contains a probiotic strain of bifidobacteria and *Fucus evanescens* polysaccharides with prebiotic activity and broad spectrum of the biological action on the patients. The use of the synbiotic drink provided more evident reduction of the clinical symptoms, more efficient recovery of the intestinal microflora and higher percentage of the patients cure vs. the routine therapy and the therapy with inclusion of sour milk bifidobacterin.

Key words: dysbacteriosis, synbiotics, *Fucus evanescens* polysaccharides, fucoidan, alginate, functional foods.

В настоящее время лечение заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), сопровождающихся дисбактериозом кишечника, является комплексным, включающим, как правило, антибиотики и спазмолитики, блокаторы H₂-рецепторов гистамина, антациды, препараты, устраняющие нарушение моторики ЖКТ, ферментные препараты. Неотъемлемой составляющей такой терапии являются про-, пре- или синбиотики, ос-

новное назначение которых заключается в нормализации кишечного микробиоценоза [1–4].

Как известно, микробиота представляет первичный защитный барьер макроорганизма, а метаболиты микроорганизмов являются фактором здоровья и долголетия, в связи с чем поддержание микрoэкологического статуса организма человека — одно из решающих условий здоровья [1]. Для коррекции микробиоты помимо официальных лекарственных препаратов применяют функциональные пищевые продукты (ФПП), обогащённые пробиотиками/синбиотиками (живыми микроорганизмами или веществами

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии

микробного происхождения, оказывающими при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина путём стабилизации и оптимизации функций его нормальной микрофлоры) и пребиотиками (веществами, способствующими росту индигенной микрофлоры) [3, 4].

В составе ФПП широко используются полисахариды (ПС) из морских бурых водорослей, в частности, фукоиданы, ламинараны, альгинаты, как наиболее перспективные для конструирования таких продуктов и биологически активных добавок к пище (БАД), биологически активные вещества, способные при систематическом включении в рацион человека продуктов, содержащих эти ПС, обеспечивать организм энергетическим и пластическим материалом, оптимизировать физиологические и биохимические функции [5–7].

В ряду этих ПС фукоиданы заслуживают особого внимания, что обусловлено, прежде всего, их природным происхождением, оригинальной структурой и широким диапазоном лечебно-профилактических возможностей. Важнейшие свойства фукоиданов, определяющие их включение в состав ФПП или БАД, — способность регулировать состояние иммунитета, оказывать нормализующее влияние на метаболические процессы (нормализация уровня сахара крови и функциональной активности печени, липидного спектра). Не менее важны в этом аспекте про/противовоспалительная и противоопухолевая активность, а также антикоагулянтное действие фукоиданов [7–11].

Ряд полезных эффектов на организм оказывают альгинаты (иммуностимулирующие, противоопухолевые, радиозащитные эффекты, способность сорбировать и выводить из организма токсины, продукты метаболизма, холестерин, тяжёлые металлы, радионуклиды), что позволяет использовать их не только в составе ФПП и БАД, но и в качестве монокомпонентных лекарственных средств [7, 12].

Фукоиданы, ламинараны, альгинаты проявляют пребиотическую активность, что также является их положительным преимуществом как компонентов ФПП и БАД. При пероральном поступлении они способны оказывать полезный эффект на кишечную микрофлору, на процессы переваривания и всасывания в кишечнике, усвояемость липидов [9, 13, 14].

Согласно прогнозам ведущих специалистов мира в области нутрициологии и медицины, в ближайшие 15–20 лет доля ФПП в питании человека в цивилизованных странах значительно возрастёт, что позволит на 30–50% вытеснить из сферы реализации многие традиционные лекарственные препараты из арсенала средств сохране-

ния здоровья, профилактической и восстановительной медицины [15, 16]. В связи с этим ФПП синбиотической направленности, имеют большие перспективы в качестве составной части рациона профилактического и лечебного питания населения. Нами разработан инновационный продукт — синбиотический напиток, представляющий комбинацию пробиотика (бифидобактерии) и полисахаридов (фукоидана и альгината) из бурой водоросли *Fucus evanescens*.

Цель работы — оценить эффективность применения нового синбиотического напитка (СН) у пациентов с хроническими заболеваниями ЖКТ, сопровождающимися дисбактериозом кишечника.

Материал и методы

В рандомизированном исследовании, обеспечивающим случайное распределение на 3 группы, приняли участие 60 пациентов с хроническими заболеваниями ЖКТ.

Первая группа больных получала традиционную медикаментозную терапию, вторая группа — традиционную терапию с включением кисломолочного бифидумбактерина в течение 6 недель (по 100 г дважды в день за 30 мин до еды), третья группа — терапию с включением СН курсом 6 недель (по 100 г дважды в день за 30 мин до еды). Для сравнения проводили оценку показателей состояния кишечного микробиоценоза у группы условно здоровых лиц.

Синбиотический напиток представляет собой кисломолочный биопродукт, изготавливаемый путём сквашивания стерилизованного молока с использованием бифидоэваски, приготовленной на основе производственных штаммов бифидобактерий *B. longum* В379М, *B. bifidum* 791, или ЛВА-3 (пробиотиков) с добавлением полисахаридов из бурой водоросли *Fucus evanescens* с пребиотическим действием (в количестве 0,1 мас. %). Синбиотический напиток содержит не менее 10^9 КОЕ/г (см³) бифидобактерий (ТУ 9222-008-01898115-2011 «Биопродукт кисломолочный «Бифидомарин»).

Эффективность применения СН при лечении больных оценивали по клиническим симптомам и лабораторным показателям состояния кишечного микробиоценоза в динамике. Повторное обследование пациентов проводили через 2–3 недели по окончании приёма кисломолочного бифидумбактерина или СН.

Диагноз дисбактериоза устанавливался клинически с подтверждением данными микробиологического исследования кала. Обследование и лечение пациентов проводилось в соответствии с отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» ОСТ 91500.11.0004-2003.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica-7» и «Геостат» [17]. Для оценки значимости различий количественных признаков использовали непараметрический *W*-критерий Вилкоксона (для сравнения показателей до и после лечения и для сравнения средних 2 групп), для номинального сравнения повторных измерений использовали критерий Мак-Нимара, для сравнения выборок по номинальным признакам — критерий χ^2 с поправкой Йейтса.

Результаты и обсуждение

Характеристика пациентов с учётом возраста, пола, диагноза представлена в табл. 1.

У преобладающего большинства больных выявлено наличие диспепсического (снижение аппетита, срыгивание, отрыжка, тошнота) и интестинального (вздутие живота, урчание кишечника,

Таблица 1. Характеристика пациентов с учётом возраста, пола, диагноза

Характеристика пациентов	Число пациентов, абс. (%)		
	первая группа	вторая группа	третья группа
Возраст	48,4±6,8	46,3±5,5	47,2±7,2
Пол (мужчины/женщины)	9/11	3/17	4/16
Диагноз			
Хронический гастродуоденит	14 (70)	4 (20)	5 (25)
Язвенная болезнь желудка в анамнезе	3 (15)	6 (30)	4 (20)
Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки в анамнезе	7 (35)	10 (50)	8 (40)
Хронический холецистит	1 (5)	3 (15)	3 (15)
Хронический панкреатит	5 (25)	6 (30)	4 (20)
Хронический колит	2 (10)	20 (100)	3 (15)
Синдром раздражённого кишечника	20 (100)	20 (100)	20 (100)

Таблица 2. Динамика клинического состояния больных в группах в процессе лечения

Жалобы	Число пациентов, абс. (%)					
	первая группа		вторая группа		третья группа	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Диарея (жидкий стул 4—6 раз в сутки)	7 (35)	2(10)	7 (35)	0*	8 (40)	0*
Неустойчивый стул	8(40)	4(20)	10 (50)	3 (15)*	6 (30)	1 (5)*
Метеоризм	12(60)	4(20)*	8 (40)	2 (10)*	9 (45)	3 (15)*
Боли в животе (средней интенсивности)	13(65)	3(15)*	12 (60)	2 (10)*	10 (50)	0*
Вздутие живота	16(80)	6(30)*	16 (80)	5 (25)*	14 (70)	2 (10)*

Примечание. Показатели абс. (%); * — $p < 0,05$ при сравнении показателей до и после лечения (использован критерий Мак-Нимара); $n=20$.

Таблица 3. Распределение пациентов по степени дисбактериоза до и после лечения

Степень дисбиоза	Первая группа		Вторая группа		Третья группа	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
I	12	1	11	3	9	0
II	8	8	9	3	11	3
III	0	0	0	0	0	0
Всего	20	9	20	6	20	3

склонность к запорам или жидкий стул с непереваженными остатками пищи) синдромов. Частота встречаемости жалоб, отражающих клинические проявления кишечной диспепсии, и отличия динамики клинического состояния больных в группах в процессе лечения представлены в табл. 2.

Среди всех обследуемых пациентов выявленные нарушения до лечения расценивались в 53,3% случаев как I степень дисбактериоза и в 46,7% случаев как II степень дисбактериоза. Больных с III степенью дисбиотических нарушений не выявлено (табл. 3).

У пациентов 1-й группы дисбиотические нарушения характеризовались снижением по сравнению с показателями у здоровых лиц количественного содержания бифидо- и лактобактерий, количественными и качественными изменениями *Escherichia coli* (увеличением содержания *E. coli* с изменёнными свойствами — лактозонегативных, а также гемолитических *E. coli*; $p < 0,05$). При повторном обследовании пациентов (через 2 недели по окончании лечения) восстановление микробиоценоза наблюдалось только у 55% пациен-

тов. Нормализации содержания бифидобактерий, лактобактерий, лактозонегативной и гемолитической *E. coli* не отмечено.

У пациентов 2-й группы до начала лечения дисбиотические изменения также характеризовались снижением по сравнению с показателями у здоровых лиц количества бифидобактерий, лактобактерий, увеличением содержания лактозонегативных *E. coli* ($p < 0,05$). Гемолитические *E. coli* у больных этой группы отсутствовали. При повторном (после лечения) обследовании у 70% пациентов выявлено восстановление микробиоценоза (нормализация содержания бифидобактерий ($p < 0,05$), снижение титра лактозонегативной *E. coli* ($p < 0,05$)).

У пациентов 3-й группы до начала лечения также наблюдалось снижение количественного содержания бифидо- и лактобактерий ($p < 0,05$), увеличение содержания *E. coli* с изменёнными свойствами — лактозонегативных ($p < 0,05$), а также гемолитических *E. coli* ($p < 0,05$). По окончании приёма СН выявлено восстановление микробиоценоза у 85% пациентов: нормализация содержа-

Таблица 4. Состояние микробиоценоза кишечника пациентов 1-й, 2-й и 3-й групп после лечения по сравнению с группой условно здоровых лиц

Микроорганизмы	Количество микробных клеток в 1 г фекалий (КОЕ/г)			
	условно здоровые	первая группа	вторая группа	третья группа
Бифидобактерии	2,35±0,74×10 ⁹	0,68±0,10×10 ^{9*}	0,10±0,02×10 ^{9*}	2,73±0,47×10 ⁹
Лактобактерии	5,77±4,98×10 ⁷	0,55±0,10×10 ^{7*}	0,10±0,04×10 ^{7*}	0,92±0,26×10 ^{7*}
<i>E.coli</i> типичные	3,45±0,43×10 ⁷	2,51±0,86×10 ⁷	3,56±0,90×10 ⁷	1,91±0,48×10 ⁷
<i>E.coli</i> лактозонегативные	2,21±0,55×10 ⁴	1,65±0,81×10 ⁴	5,12±0,12×10 ⁴	2,0±1,9×10 ⁴
<i>E.coli</i> гемолитические	0	12,0±6,8×10 ^{4*}	0	0,20±0,11×10 ⁴
Энтерококки	2,68±0,77×10 ⁶	0,58±0,49×10 ⁶	4,95±0,84×10 ⁶	5,33±0,99×10 ⁶
Стафилококк сапрофитный	5,92±0,6×10 ⁴	5,24±0,71×10 ⁴	5,20±0,69×10 ⁴	6,30±0,62×10 ⁴
Стафилококк золотистый	0	0	0	0
Представители рода <i>Clostridium</i>	2,88±0,95×10 ⁴	7,94±2,92×10 ^{4*}	3,75±1,06×10 ⁴	2,79±1,16×10 ⁴
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	4,92±0,67×10 ³	5,10±0,68×10 ³	5,40±0,72×10 ³	6,40±0,67×10 ³
Представители рода <i>Proteus</i>	3,5±0,52×10 ³	3,8±0,53×10 ³	4,76±0,68×10 ³	3,50±0,69×10 ³

Примечание. Показатели $M \pm m$; * – ($p < 0,05$) – значимость различий при сравнении показателей условно здоровых и больных 1-й, 2-й и 3-й групп после лечения (использован W-критерий Вилкоксона); $n=20$.

ния бифидобактерий ($4,18 \pm 1,27 \times 10^8$ до и $2,73 \pm 0,47 \times 10^9$ после лечения; $p < 0,05$), повышение уровня лактобактерий ($0,88 \pm 0,08 \times 10^6$ до и $0,92 \pm 0,26 \times 10^7$ после лечения; $p < 0,05$), снижение титра гемолитической *E.coli* ($2,67 \pm 1,51 \times 10^7$ до $0,20 \pm 0,11 \times 10^4$ после лечения; $p < 0,05$).

В табл. 4 приведены данные по состоянию микробиоценоза кишечника всех больных после лечения. Анализ полученных результатов показал, что только у пациентов 3-й группы содержание бифидобактерий восстанавливалось до уровня условно здоровых лиц (значимые отличия по сравнению с этой группой отсутствуют).

При сравнении показателей микробиоценоза кишечника пациентов 1-й и 3-й групп установлено, что после традиционного лечения содержание бифидобактерий в 3-й группе значимо ($p < 0,05$) превышало таковые показатели в 1-й группе, а уровень гемолитических *E.coli* в 1-й группе оставался более высоким, чем в 3-й группе ($p < 0,05$) (см. табл. 4).

Сравнение соответствующих показателей микробиоценоза кишечника пациентов 2-й и 3-й групп показало, что содержание бифидо- и лактобактерий после лечения в 3-й группе значимо превышало таковые показатели во 2-й группе ($p < 0,05$), что свидетельствует о более эффективном восстановлении нормофлоры под влиянием СН. Сохранение гемолитических *E.coli* в 3-й группе объясняется их изначально высоким титром, тогда как у пациентов 2-й группы эти бактерии отсутствовали (табл. 4).

После лечения в 1-й группе неизлеченными оставались 9 человек (45%): дисбиотические нарушения сохранялись у 1 пациента из 12, имевших нарушения I степени, и у всех пациентов с нарушениями II степени (у 4 пациентов степень нарушений снизилась до I степени). Во 2-й группе неизлеченными оставались 6 человек (30%): дисбиотические нарушения сохранялись у 3 из 11 пациентов, имевших нарушения I степени, и у 3 из

9 пациентов, имевших нарушения II степени. В 3-й группе были излечены все 9 пациентов, имевших нарушения I степени, и 8 пациентов (85%), имевших нарушения II степени. Неизлеченными оставались только 3 человека (15 %) (см. табл. 3).

Приведённые данные свидетельствуют о клинической эффективности как традиционной медикаментозной терапии с добавлением кисломолочного бифидумбактерина (2-я группа), так и медикаментозной терапии с добавлением СН (3-я группа). В то же время анализ данных табл. 2 выявил более выраженную редукцию симптомов и жалоб, сопряжённых с диспепсическим и кишечным синдромами, у пациентов 3-й группы, получавших в комплексе с базисной терапией СН. У пациентов 2-й и 3-й групп после лечения исчезали жалобы на диарею. Жалобы на неустойчивый стул после лечения сохранялись лишь у 5 % пациентов 3-й группы, у пациентов 1-й и 2-й групп — в 20% и 15% случаев соответственно. Значимое исчезновение метеоризма регистрировалось у пациентов всех групп. Пациенты 3-й группы по окончании лечения не жаловались на боли в животе, и значительно реже по сравнению с пациентами 1- и 2-й групп жаловались на вздутие живота (см. табл. 2).

Эффективность лечения по оценкам больных представлена в табл. 5. Значимые различия выявлены для оценки «отлично» у пациентов 3-й группы по сравнению с таковой у пациентов 1- и 2-й группы (70, 10, 30% соответственно), что повлекло уменьшение доли остальных оценок у пациентов 3-й группы.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что применение СН в комплексной терапии пациентов с хроническими заболеваниями кишечника, сопровождается более выраженной редукцией клинических симптомов, более эффективным восстановлением микрофлоры кишечника, более высоким процентом излеченности по сравнению с применением кисломолочного бифидобактерина.

Таблица 5. Эффективность лечения по оценкам пациентов

Критерии эффективности лечения	Число пациентов, абс. (%)		
	первая группа	вторая группа	третья группа
Отличная	2 (10)	6 (30)	14 (70)*#
Хорошая	8 (40)	8 (40)	5 (25)
Удовлетворительная	5 (25)	2 (10)	1 (5)
Отсутствие эффекта	3 (15)	2 (10)	0
Ухудшение	2 (10)	2 (10)	0
	(обострение хронических заболеваний ЖКТ)	(обострение хронических заболеваний ЖКТ)	

Примечание. Показатели $M \pm m$; * — ($p < 0,05$) при сравнении показателей 1-й и 3-й групп; # — $p < 0,05$ при сравнении показателей 2-й и 3-й групп (использован критерий z с поправкой Йейтса); $n=20$.

Выявленный нами выраженный клинический эффект СН «Бифидомарин» обусловлен тем, что в его состав входит два биологически активных компонента — пробиотический штамм бифидобактерий в количестве не менее 10^9 КОЕ/г (см^3) (как лидирующий пробиотик в ассортименте пробиотических препаратов и ФПП, поскольку бифидобактерии составляют основу микроэкологической системы ЖКТ) и ПС (фукоидан и альгинат) из бурой водоросли *F. evanescens*.

Ранее нами было показано, что эти ПС проявляют пребиотическую активность [18]. Кроме того, нами установлена полифункциональность действия этих ПС на организм. В частности, благодаря иммуномодулирующей и противовоспалительной активности, способности нормализовать метаболический статус, применение ПС из бурой водоросли *F. evanescens* в комплексе с базисной терапией у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей приводило к коррекции липидного обмена, иммунного и цитокинового статуса [19]. Наличие гепатопротекторной активности вкупе с вышеперечисленными свойствами этих ПС способствовало снижению воспалительного процесса, нормализации функциональной активности и морфометрических показателей печени, восстановлению баланса системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, иммуномодулирующему влиянию на факторы врождённого и адаптивного иммунитета у больных с хроническим вирусным гепатитом С [20].

ЛИТЕРАТУРА

1. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под ред. Е. И. Ткаченко, А. Н. Суворова, СПб.: 2007; 238.
2. Осипенко М. Ф. Применение пробиотиков в лечении патологии внутренних органов. Фарматека 2005; 14; 16—20.
3. Шендеров Б. А. Пробиотики, пребиотики и синбиотики. Общие и избранные разделы проблемы. Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки 2005; 2; 23—26.
4. Успенский Ю. П. Метаболический синдром у больных с заболеваниями органов пищеварения. Место лечебного питания в комплексной терапии заболеваний органов пищеварения, ассоциированных с метаболическим синдромом. Клин диетол 2004; 1; 14—21.
5. Морские водоросли в восстановительной медицине, комплексной терапии заболеваний с нарушением метаболизма / Под ред. А. Н. Разумова, А. И. Вялкова, М.: 2006; 104.
6. Lordan S., Ross R. P., Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. Mar Drugs 2011; 9; 6: 1056—1100.
7. Holdt S. L., Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. J Appl Phycol 2011; 23: 543—547.
8. Fitton J. H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. Mar Drugs 2011; 9: 1731—1760.
9. Sagawa T. I. H., Kato I. Fucoidan as functional foodstuff. Structure and biological potency. Japan J Phycol (Sorui) 2003; 51; 19—25.
10. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. Mar Drugs 2011; 9; 2: 196—223.
11. Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. Molecules 2008; 13: 1671—1695.

Заключение

С учётом широкого спектра биологической активности ПС из бурой водоросли *F. evanescens* (фукоидана и альгината), способности нормализовать иммунный и метаболический статус человека и проявлять пребиотические эффекты, апробировано их применение в составе СН при лечении хронических заболеваний ЖКТ и дисбактериоза кишечника.

Разработанный нами СН, содержащий пробиотик (бифидобактерии) и ПС морских водорослей, способствует редукции клинических симптомов и эффективному восстановлению микрофлоры кишечника, что свидетельствует о клинической эффективности терапии с включением СН у пациентов с хроническими заболеваниями ЖКТ, сопровождающимися дисбиотическими нарушениями.

Полученные результаты позволяют рекомендовать применение СН в составе комплексной терапии больных, имеющих хронические заболевания ЖКТ и дисбактериоз кишечника.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ №4000 от 01.05.2010 г. «Клинико-иммунологическая эффективность нового синбиотического продукта категории функционального питания (кисломолочный напиток с *B. bifidum*, обогащённый полисахаридами из бурой водоросли *Fucus evanescens*)».

12. Хотимченко М. Ю. Фармаконутрициология альгинатов. Владивосток: 2009; 169.
13. Lynch M.B., Sweeney T., Callan J.J. et al. The effect of dietary Laminaria-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. J Sci Food Agric 2010; 90; 430—437.
14. O'Sullivan L., Murphy B., McLoughlin P. et al. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. Mar. Drugs 2010; 8: 2038—2064.
15. Шендеров Б. А. Современное состояние и перспективы развития концепции «Функциональное питание». Пищевая промышленность 2003; 5: 4—7.
16. Kalliomaki M., Collado M., Salminen S., Isolauri E. Functional foods forum and program on health biosciences, Univ. of Turku. Amer J Clin Nutr 2008; 88: 6: 1643—1647.
17. Смолин В. А. Математическое моделирование в геологии и геофизике (статистика). Владивосток, 2007; 230.
18. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Макаренко И.Д. и др. Пребиотический потенциал полисахаридов из бурой водоросли *F. evanescens* и значение для клинического использования. Тихоокеан мед журн 2012; 1: 37—40.
19. Майстровский К.В., Запорожец Т.С., Раповка В.Г. и др. Коррекция липидного обмена у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей сульфатированным полисахаридом из бурой водоросли *Fucus evanescens*. Тихоокеан мед журн 2010; 4: 47—51.
20. Филонова Н. В., Запорожец Т.С., Ермолицкая С.А. и др. Влияние фукоидана из *Fucus evanescens* на показатели иммунного и цитокинового статуса у больных хроническим вирусным гепатитом С при включении в комплекс лечебных мероприятий. Вест Урал мед акад наук 2010; 2/1: 215—216.

Сравнительная эффективность этиотропной терапии больных HBeAg-положительным хроническим гепатитом В (по материалам международного сравнительного плацебо контролируемого исследования)

В. В. СТЕЛЬМАХ¹, М. Г. РОМАНЦОВ¹, Т. В. СОЛОГУБ⁵, А. А. ШУЛЬДЯКОВ²,
В. К. КОЗЛОВ⁴, Н. Х. ТУАН⁶, М. ОЮНГЕРЕЛ⁷, В. М. ФРОЛОВ³

¹ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург

² ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского», Саратов

³ УО «Луганский государственный медицинский университет», Луганск, Украина

⁴ Институт высоких медицинских технологий ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственного университета, Санкт-Петербург

⁵ ФГУН НИИ гриппа МЗ РФ; Санкт-Петербург

⁶ Госпиталь 103, Ханой, Вьетнам

⁷ Национальный центр по лечению инфекционных заболеваний, Улан-Батор, Монголия

Comparative Efficacy of Etiotropic Therapy of Patients with HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B (by the Data of the International Comparative Placebo-Controlled Study)

V. V. STELMAKH, M. G. ROMANTSOV, T. V. SOLOGUB, A. A. SHULDYAKOV,
V. K. KOZLOV, N. KH. TUAN, M. OYUNGEREL, V. M. FROLOV

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

V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

Institute of High Medical Technologies, St.Petersburg, Russia

Research Institute of Influenza, St.Petersburg, Russia

Hospital No. 103, Hanoi, Vietnam

National Centre for Treatment of Infectious Diseases, Ulan-Bator, Mongolia

В сравнительном плацебо контролируемом исследовании принимало участие 647 пациентов с верифицированным диагнозом «хронический вирусный гепатит В (HBeAg+)», ранее не получавших противовирусной терапии нуклеотидными аналогами или интерферонами. В качестве исследуемого препарата представлен индуктор раннего интерферона — циклоферон, который получали 323 пациента хроническим гепатитом В (ХГВ), с HBeAg (+) штаммом HBV при проведении противовирусной терапии в течение 48 недель в комбинации с ламивудином. Группу сравнения составили 324 пациента с хроническим вирусным гепатитом В, которым проводилась противовирусная терапия ламивудином + плацебо также на протяжении 48 недель. Показано преимущество применения комбинированной противовирусной терапии: циклоферон + ламивудин в лечении больных хроническим вирусным гепатитом В (HBeAg+), по сравнению с терапией ламивудин + плацебо по ряду показателей: частоте достижения биохимической ремиссии, развитию вирусологического ответа, частоте достижения сероконверсии по HBeAg к 48-й неделе терапии и частоте достижения клиренса HBsAg. Комбинированная терапия обеспечивала меньшую частоту возникновения рецидивов к 24-й неделе наблюдения. Более высокая эффективность применения комбинированной противовирусной терапии указывает на роль собственного противовирусного эффекта циклоферона и наличие иммуномодулирующего, интерферониндуцирующего эффекта циклоферона в элиминации вирус-инфицированных гепатоцитов. 48-недельный курс комбинированной противовирусной терапии HBeAg-положительных пациентов с ХГВ целесообразно применять как терапию первой линии у пациентов, ранее не получавших аналоги нуклеозидов, а также как вариант терапии ламивудин-рефрактерных пациентов.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В, HBV, HBeAg+, индуктор интерферона, противовирусные средства, ламивудин, циклоферон.

Comparative placebo-controlled study entrolled 647 patients with verified diagnosis of chronic virus hepatitis B (HBeAg+), not previously subjected to antiviral therapy (with nucleotide analogues or interferons). The drug under the investigation was cycloferon, an earlier interferon inductor. The antiviral combination therapy of the main group patients (323 subjects) included the use of cycloferon + lamivudine for 48 weeks and the therapy of the control group patients (324 subjects) included the use of lamivudine + placebo for 48 weeks. The cycloferon and lamivudine combination antiviral therapy was shown preferable vs. the lamivudine + placebo therapy by biochemical remission, virological response, seroconversion by HBeAg by the 48th week of the treatment and HBsAg clearance. The combination therapy provided lower frequency of the relapses within 24 weeks of the observation. The higher efficacy of the antiviral activity of cycloferon itself and its immunomodulating and interferon-inducing activity on elimination of the virus-infected hepatocytes. The

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 195067, Санкт-Петербург, пр. Пискаревский, д. 47, 18 павильон, Кафедра внутренних болезней и нефрологии СЗГМУ им. И. И. Мечникова

use of the 48-week course of the antiviral combination therapy is advisable as the prime treatment in the management of patients with HBeAg-positive chronic hepatitis not previously treated with nucleoside analogues and as a variant of therapy for lamivudine-refractory patients.

Key words: chronic virus hepatitis B, HBV, HBeAg+, interferon inductor, antivirals, lamivudine, cycloferon.

Введение

Хронический гепатит В — распространённое (более 400 млн человек) инфекционное заболевание с признаками хронического поражения печени [1, 2]. Несмотря на активное внедрение вакцинации, летальность, обусловленная последствиями цирротической стадии заболевания, декомпенсированной печеночной недостаточностью и гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК), остается высокой, унося ежегодно около 1 млн человеческих жизней. Всё это имеет высокое клиничко-социальное значение заболевания и необходимость поиска оптимальных, более эффективных методов его лечения [1–4].

Основной задачей терапии ХГВ является эрадикация вируса с подавлением некро-воспалительного процесса, с целью снижению риска цирроза печени, печёночной недостаточности, ГЦК и необходимости трансплантации печени [5–8].

Эффективность противовирусной терапии препаратами «короткодействующих» интерферонов в монорежиме у HBeAg-позитивных пациентов составляет 20–40%, а при использовании пегилированных форм она несколько выше. Частота вирусологического ответа (по негативации ДНК HBV) у HBeAg-позитивных пациентов через 6 месяцев после окончания 48-недельного курса терапии пегилированными интерферонами колеблется от 7 до 14% [9–12].

Рекомбинантные интерфероны (ИФН), являясь аналогами естественных пептидных биорегуляторов, обладают спектром биологической активности, идентичным эндогенным молекулам. Основная цель их использования как лекарственных препаратов — восполнение недостатка естественных медиаторов и воспроизведение их биологических функций на молекулярном уровне — активация внутриклеточных систем, направленных на элиминацию вируса. Преимуществом рекомбинантных интерферонов- α , в отличие от нуклеотидных аналогов, является отсутствие резистентности при продолжительности курсового лечения в течение 48 недель, высокая частота достижения HBe- и HBs-сероконверсии, а также потенциальная способность развития стойкого вирусологического ответа с элиминацией вируса (3–7%), сохраняющегося после окончания лечения HBsAg [10, 11].

К сожалению, приходится констатировать высокую частоту побочных эффектов: гриппоподобный синдром, эмоциональная лабильность,

депрессия, миелосупрессия, снижение массы тела, выпадение волос, а также стоимость препаратов рекомбинантных интерферонов существенно затрудняют их применение в клинической практике [13, 14].

Частота вирусологического ответа (по негативации ДНК HBV) у HBeAg-позитивных пациентов через 48 недель от начала терапии составляет при применении ламивудина — 36–44%, адефовира — 13–21%, энтекавира — 67%, телбивудина — 60%, тенофовира — 76%, а частота сероконверсии HBeAg после 48-недельного курса терапии нуклеотидными аналогами колеблется от 12 до 22%, на фоне крайне низкой элиминации HBsAg, не превышающей 3%, а при применении адефовира и телбивудина — 0,5% [11, 15–19].

Положительным моментом применения препаратов этой группы является простота использования, хорошая переносимость. Однако ни один из нуклеотидных аналогов не способен привести к клиренсу циркулярной ковалентно связанной ДНК HBV. С помощью нуклеотидных аналогов доступно управление темпами вирусной репликации, что обеспечивает снижение прогрессирования заболевания. Комбинированная противовирусная терапия (с применением пегилированных интерферонов в сочетании с нуклеотидными аналогами) повышает эффективность, в сравнении с применением пегилированных интерферонов в монотерапии.

Более глубокое изучение патогенеза заболевания и регуляции иммунного ответа способствует появлению новых подходов в оптимизации этиопатогенетической терапии ХГВ. Обнадёживающей перспективой лечения является комбинация различных методов подавления вирусной репликации с помощью нуклеотидных аналогов и индукции адекватного иммунного ответа индукторами интерферона [20, 21].

Обеспечивая ту же целевую установку терапии, что и при заместительной коррекции рекомбинантными интерферонами — увеличение синтеза ИФН в организме, индукторы интерферона как лекарственные средства обладают рядом существенных преимуществ перед терапией препаратами ИФН- α , в частности: эндогенный интерферон, вырабатываемый в ответ на введение интерферогенов, не обладает антигенностью; его синтез в организме сбалансирован и находится под воздействием контрольно-регуляторных механизмов, обеспечивающих защиту организма от перенасыщения; индукторы ИФН индуцируют его синтез в

определённых популяциях клеток, что имеет преимущества перед поликлональной стимуляцией иммунцитов рекомбинантными ИФН; однократное введение индукторов ИФН обеспечивает относительно длительную циркуляцию ИФН на терапевтическом уровне; отсутствие побочных эффектов, свойственных экзогенно вводимым препаратам рекомбинантных ИФН [22].

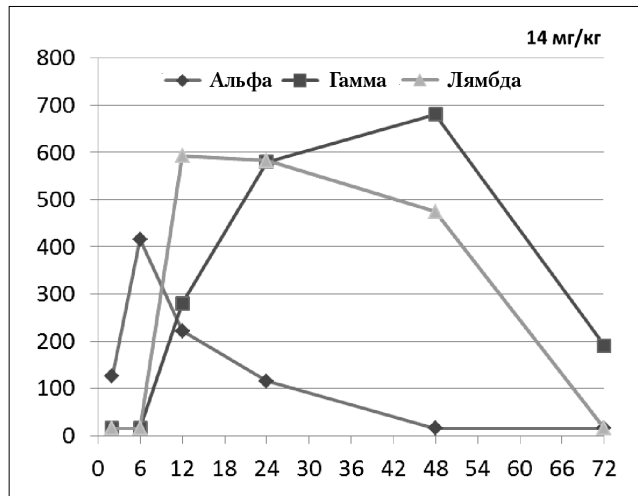
Среди индукторов интерферона клинически эффективными и нашедшими применение оказались лишь немногие, одним из них является меглюмина акридонатацетат (циклоферон), вызывающий образование интерферонов α/λ и γ типов, обеспечивая неспецифическую защиту клеток организма от проникновения и репродукции чужеродной генетической информации (вирусов и некоторых других внутриклеточных микроорганизмов), а также участие в регуляции развития основных стадий специфического иммунного ответа [23, 24].

Лекарственная интерферониндуцирующая терапия, способствующая синтезу ИФН различными клетками *in vivo*, рассматривается как альтернативный подход к оптимизации противовирусной терапии больных хроническими вирусными гепатитами [23, 25, 26]. Полная стойкая ремиссия (со снижением HBV-DNA до неопределяемых цифр и сохранением нормализации АлАТ в течение 6 месяцев после окончания лечения) наблюдалась с применением циклоферона — у 33% больных, ламивудина — у 44%, комбинированной терапии (циклоферон + ламивудин) — у 54% больных [21].

При оценке эффективности и переносимости циклоферона и реаферона + ламивудин у больных, не ответивших на 24-недельный курс ламивудина (260 больных), полная стойкая ремиссия установилась с использованием комбинации «интерферон- α + циклоферон» — у 44,1%, с применением комбинации «циклоферон + ламивудин» — у 35,7% больных, а комбинация «интерферон- α + ламивудин» обеспечила эффективность в 39,7% случаев. Наилучшая переносимость при 24-недельном курсе отмечена при использовании двух комбинаций «циклоферон+ламивудин» и «циклоферон + интерферон» [20].

Различные режимы назначения препаратов рекомбинантных интерферонов и циклоферона пациентам с ХГВ способствуют не только повышению противовирусного эффекта, но и уменьшению частоты и выраженности побочных явлений [27, 28].

Учитывая положительный опыт противовирусной терапии [20, 21] ламивудином при HBeAg(+) ХГВ представляется перспективной комбинированная противовирусная терапия с индуктором интерферона, обладающего иммунокорригирующим и противовирусным действием — циклофероном, в комбинации с ламивудином [29].



Индукция эндогенных интерферонов циклофероном в разовой дозе 14 мг/кг массы тела

Изучение кинетики накопления интерферонов в ответ на индукцию показало, что циклоферон индуцирует синтез раннего интерферона в В-клетках и макрофагах [13].

Так, циклоферон — меглюминовая соль акридонуксусной кислоты уже в дозе 4—14 мг/кг вызывает продукцию α/β , γ , λ -ИФН от 2 до 72 часов от момента введения (рисунок), реализуя, таким образом, антивирусную и иммуномодулирующую активность.

Гипореактивная фаза в ответ на стимуляцию циклофероном эндогенного интерферона длится 2 суток. Прерывистая методика введения препарата предполагает индуктивный механизм воздействия, учитывающий биологический цикл ответа иммунокомпетентных клеток на индукцию в виде выработки эндогенного интерферона [22].

Нами предпринята попытка оценки эффективности и безопасности комбинированной терапии циклофероном в сочетании с ламивудином в сравнении с терапией ламивудином + плацебо, получаемой в течение 48 недель больными хроническим гепатитом В HBeAg, обусловленным (+) штаммом HBV.

Материал и методы

Обследовали 647 пациентов (504 мужчин и 143 женщины) с хроническим вирусным гепатитом В (HBeAg+). Методом рандомизации сформированы две группы больных. Из них 323 пациента основной группы получали ламивудин по 100 мг внутрь 1 раз в сутки ежедневно через 2 ч после еды и циклоферон по 600 мг внутрь за 30 мин до еды 3 раза в неделю на протяжении 48 недель; 324 пациента группы сравнения получали ламивудин по 100 мг внутрь 1 раз в сутки ежедневно через 2 ч после еды и плацебо на протяжении 48 недель. Процедура рандомизации осуществлялась методом конвертов и таблиц случайных чисел. Диагноз ставился на основании совокупности клиничко-лабораторных данных в соответствии с классификацией МКБ-10. Клиническое наблюдение проводилось соответственно этическим принципам, заложенными Хельсинкской декларацией и отражёнными в ICH (Руководство по надлежащей клинической практике).

Таблица 1. Демографические и исходные характеристики пациентов

Характеристики	Ламивудин + циклоферон (n=323)	Ламивудин + плацебо (n=324)	p
Возраст, лет	33,2±9,8	32,5±10,2	0,86
Мужской пол, абс. (%)	248 (77)	256 (79)	0,84
Раса или этническая группа, абс. (%)			
Европейцы	210 (65)	224 (63)	0,76
Азиаты	113 (35)	120 (37)	
Регион, абс. (%)			
РФ	323 (100)	324 (100)	1,0
Индекс некро-воспалительной активности (Knodell)	7,7±2,9	7,6±2,7	0,42
Стадия фиброза по Ishak	2,5±1,2	2,4±1,3	0,31
Стадия >3, %	41	43	0,68
Стадия >5 (цирроз), %	5	6	0,78
Средний уровень HBV DNA			
Методом ПЦР, log копий/мл	7,1±1,7	7,0±1,8	1,0
HBeAg(+), абс. (%)	323 (100)	324 (100)	1,0
HBeAg антитела-негатив., абс. (%)	323 (100)	324 (100)	1,0
АлАТ, ЕД/л	140±88,3	146±74,5	0,83

Комплексное обследование включало осмотр по органам и системам, оценку признаков заболевания (симптом/синдром). Лабораторные методы исследования включали клинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови с определением уровней билирубина, аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), щелочной фосфатазы (ЩФ), глюкозы, креатинина, показателя коагулограммы: протромбин по Квику, протромбиновое время, АПТВ, международное нормализованное отношение (МНО), фибриноген по Клауссу. Вирусные антигены HBsAg, HBeAg и антитела к вирусам HBsAb, HBeAb, HBcorIgM, HBcorIgG, HDVlgG, определение антител к HCV (HCVcorIgM, HCVcorIgG,) проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Уровень ДНК HBV измеряли методом ПЦР Roche COBAS Amplicor Monitor, порог чувствительности 300 копий/мл. Проведено молекулярно-биологическое исследование крови на детекцию ДНК HBV (метод ПЦР для «мутантных» штаммов YMDD).

Инструментальные методы исследования включали УЗИ органов брюшной полости, щитовидной железы, электрокардиографию (ЭКГ), фиброгастродуоденоскопию (ФГДС), чрескожную биопсию печени с определением индекса гистологической активности (Knodell) и стадии фиброзирования (Ishak) [30].

Указаниями на цирротическую стадию хронического гепатита служили изменение структуры печени, наличие признаков портальной гипертензии (увеличение диаметра воротной вены более 15 мм и/или наличие асцита на УЗИ), варикозного расширения вен пищевода (ФГДС), клинически выраженный отёчно-асцитический синдром, не связанный с патологией других органов и систем организма.

Для обработки полученных данных использованы пакеты программ Office Std. 2007 (Excel 2007) и Statistica 6.0. Оценка значимости различия проводилась непараметрическими методами: между независимыми группами проводилась при помощи U-критерия Манна-Уитни, между связанными выборками — при помощи теста Вилкоксона и Sign теста. Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p=0,05$, т. е. различие считалось статистически значимым, если $p<0,05$.

Под наблюдением находились мужчины и женщины в возрасте от 18 до 80 лет с верифицированным диагнозом «хронический HBeAg-позитивный вирусный гепатит В», с наличием HBsAg (+) более 6 месяцев; HBeAg (+); $5 \log_{10} < \text{ДНК HBV} < 9 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$; повышение активности АлАТ в сыворотке крови в 2—5 раз выше верхней границы нормы. Оценка эффективности проводимой терапии проводилась на 12-, 24-,

36-, 48-й неделе терапии, а также в течение последующих 24 недель наблюдения после окончания терапии.

Критериями эффективности считали динамику клинических симптомов и синдромов (астеновегетативного, диспепсического, холестатического, болевого, абдоминального, гепатомегалии), отражающих течение заболевания. Биохимические критерии включали оценку синдрома цитолиза, холестаза, мезенхимального воспаления, белок-синтетической функции печени. Вирусологические критерии эффективности включали оценку вирусологического ответа: отсутствие HBV-DNA (< 300 копий/мл) в сыворотке крови; учитывали и вирусологический рецидив: повышение уровня HBV-DNA в сыворотке крови более $1 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$ по сравнению с наименьшим уровнем HBV-DNA, достигнутым на фоне лечения. Оценивали и серологический ответ по HBeAg: элиминацию HBeAg, сероконверсию с появлением антител HBeAb; серологический ответ по HBsAg: элиминацию HBsAg, сероконверсия с появлением антител HBsAb. Гистологические критерии включали гистологическое улучшение (снижение индекса гистологической активности по Knodell более 2 баллов без ухудшения стадии фиброзирования) по сравнению с исходным уровнем; уменьшение стадии фиброза по Ishak более чем на 1 балл по сравнению с исходным уровнем.

Результаты и обсуждение

В исследование включено 647 пациентов (504 мужчин и 143 женщины) с хроническим гепатитом HBeAg (+) В (ХГВ). Больные наблюдаемых групп сбалансированы по исходным клиническим и демографическим характеристикам (табл. 1).

Средний возраст пациентов составил 33,2±9,8 года в основной группе и 32,5±10,2 года в группе сравнения. В конце 48-й недели противовирусной терапии уровень нормализации АлАТ в сыворотке крови был высок: у 78% (252/323) пациентов, принимавших комбинированную терапию (ламивудин + циклоферон), у 62% (201/324) пациентов, принимавших ламивудин.

На 24-й неделе наблюдения после окончания противовирусной терапии у 68% (220/323) пациентов, принимавших ламивудин + циклоферон, сохранялись нормальные значения АлАТ по сравнению с 29% (94/324) больных, которым был

Таблица 2. Показатели эффективности лечения на 24-й неделе наблюдения у пациентов с HBeAg(+) ХГВ

Показатель	Ламивудин + циклоферон (n=323)	Ламивудин + плацебо (n=324)	p
Вирусологический:			
HBV DNA <300 копий/мл ПЦР, абс. (%)	129 (40)	16 (5)	<0,001
Биохимический:			
нормализация активности АлАТ, абс. (%)	220 (68)	94 (29)	<0,001
Серологический:			
сероконверсия по HBeAg, абс. (%)	97 (30)	59 (18)	<0,001
потеря HBsAg, абс. (%)	23 (7)	4 (1)	<0,001

Таблица 3. Гистологический ответ на 48-й неделе терапии у пациентов с HBeAg(+) ХГВ

Показатель	Ламивудин + циклоферон (n=323)	Ламивудин + плацебо (n=324)	p
Пациенты с парными биопсиями, абс.	293	295	
Гистологическое улучшение (ИГА, Knodell), абс. (%)	209 (71)	168 (57)	0,01
Уменьшение стадии фиброзирования (по Ishak), абс. (%)	118 (40)	86 (29)	0,03
Индекс некро-воспалительной активности (Knodell)			
Исходный уровень	7,7	7,6	0,42
Через 48 недель	4,1	4,7	0,03

назначен курс только ламивудина (табл. 2). Неопределяемый уровень ДНК HBV (менее 300 копий/мл по данным ПЦР) на 48-й неделе у больных, получавших ламивудин + циклоферон, регистрировался у 46% пациентов против 38,0% больных, получавших ламивудин ($p < 0,01$). Снижение виремии от исходного уровня на 48-й неделе у получавших ламивудин + циклоферон составило $-6,0 \log$ копий/мл, чем у получавших ламивудин ($-5,3 \log$ копий/мл, $p < 0,01$). У больных, получавших ламивудин + циклоферон, регистрировался меньший риск развития рецидивов к 24-й неделе периода наблюдения (13 против 86%, $p < 0,001$).

Первичное отсутствие ответа определялось как отсутствие существенных изменений в уровне HBV DNA в сыворотке крови больных (определяемый уровень остается выше $5 \log_{10}$ копий/мл) в течение всего курса терапии. Среди наблюдаемых пациентов отсутствие первичного эффекта регистрировалось значительно реже у пациентов, принимавших комбинированное лечение, по сравнению с пациентами, принимавшими ламивудин (5 и 26% соответственно, $p < 0,001$). Потеря HBeAg и сероконверсия по HBeAg на 48-й неделе терапии произошла соответственно в 38 и 32% случаев, у получавших ламивудин + циклоферон, что выше по сравнению с показателями больных, получавших ламивудин (20 и 19% соответственно, $p < 0,001$). Через 24 недели частота сероконверсии по HBeAg на фоне комбинированной терапии составила 30%, а у больных, получавших ламивудин — 18%. Высокая частота клиренса HBsAg наблюдалась у больных, получавших ламивудин + циклоферон, составив 7 против 1% ($p < 0,001$) (см. табл. 2).

Первичной конечной точкой эффективности терапии принято считать долю больных с уменьшением на 2 балла индекса гистологической ак-

тивности по Knodell (без ухудшения степени фиброза) на 48-й неделе по сравнению с исходным уровнем. Уменьшение некро-воспалительного компонента (табл. 3), по данным парных биопсий, регистрировалось чаще у пациентов, получавших комбинированное лечение (71%), против 57% больных, получавших только ламивудин ($p < 0,01$). Уменьшение стадии фиброза (по Ishak) более чем на 1 балл, по сравнению с исходным уровнем, происходило чаще у пациентов основной группы (40%) против больных, находившихся только на терапии ламивудином (29%) ($p < 0,05$).

За время наблюдения (24 недели после окончания терапии) нормальный уровень трансаминаз, неопределяемый уровень ДНК HBV и сероконверсия по HBeAg составила 30% у пациентов, принимавших комбинированную противовирусную терапию, против 5% пациентов, получавших ламивудин.

Рецидив определялся по увеличению уровня HBV DNA в сыворотке крови больных на $1 \log_{10}$ копий/мл на протяжении всего курса лечения, уровень рецидивов репликации вируса у пациентов, принимавших ламивудин с циклофероном, по сравнению с пациентами, принимавших ламивудин, составил соответственно 13 и 86%.

Устойчивость к ламивудину к 48-й неделе (мутации в YMDD-участке гена ДНК-полимеразы вируса гепатита В) обнаружена у 26% (85/324) пациентов, получавших ламивудин, и лишь у 7% (23/323) пациентов, получавших комбинированную терапию, отмечалась хорошая переносимость комбинированной терапии.

Наиболее частыми побочными эффектами были головная боль, инфекции верхних дыхательных путей, назофарингит, кашель, боль в верхней части живота, усталость, диарея. Частота нежелательных явлений (большинство из которых лёгкой

и средней тяжести) сопоставима в наблюдаемых группах лечения, никому из пациентов не потребовалась трансплантация печени. Примерно половина случаев, связанных с повышением активности АЛАТ во время лечения, связана с увеличением уровня ДНК вируса в сыворотке крови, т. е. с «вирусологическим прорывом», обусловленным развитием резистентности к ламивудину.

Эффект противовирусной терапии с включением циклоферона и ламивудина связан со значительно более высокими показателями гистологического, вирусологического и биохимического улучшения, чем при лечении только ламивудином.

Показано преимущество применения противовирусной терапии циклофероном в сочетании с ламивудином в течение 48 недель у больных хроническим вирусным гепатитом В (HBeAg+) по сравнению с лечением одним ламивудином по следующим показателям: клиренсу ДНК HBV к 48-й неделе терапии (46% против 38%, $p < 0,01$); степени подавления виремии к 48-й неделе терапии ($-6,0$ против $-5,3 \log_{10}$, $p < 0,01$); сероконверсии HBeAg к 48-й неделе терапии (32 против 19%, $p < 0,001$); элиминации HBsAg к 24-й неделе периода наблюдения (7 против 1%, $p < 0,001$); развитию биохимического ответа к 48-й неделе терапии (нормализация АЛАТ у 78 против 62%, $p < 0,01$); достижению гистологического улучшения к 48-й неделе терапии (уменьшение ИГА у 71 против 57%, $p < 0,01$); лучшего профиля резистентности: частота развития устойчивости штаммов вируса (7 против 26%, $p < 0,05$); минимизации риска развития рецидивов к 24-й неделе периода наблюдения (13 против 86%, $p < 0,001$).

Более высокая эффективность применения циклоферона с ламивудином у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В (HBeAg+) указывает на роль противовирусного эффекта, интерферониндуцирующего действия циклоферона в элиминации вирус-инфицированных гепатоцитов, а также иммуотропного влияния препарата, нацеленного на ликвидацию HBeAg и HBsAg с последующей сероконверсией.

Положительное влияние нуклеотидных аналогов на гистологическую картину печени вносит «профилактическую перспективу» в отношении риска развития цирротической стадии и гепатоцеллюлярной карциномы, подавляя репликацию HBV — причину развития некротического воспаления и фиброза [31, 32].

Для реализации противовирусного эффекта ламивудина требуется внутриклеточное фосфорилирование неактивной формы ламивудина в трифосфат. Конкурируя с цитидином, встраиваясь в синтезируемую цепь ДНК HBV, он блокирует полимеразу вируса. Прекращение приёма ламивудина до наступления сероконверсии HBeAg неизбежно приводит к реактивации ви-

русной инфекции и рецидиву активности гепатита. В ряде проведённых ранее исследований показано, что частота сероконверсии по HBeAg после 48-недельного курса противовирусной терапии ламивудином не превышает 16—18%, а при использовании других аналогов нуклеотидов — не более 22% [10, 15, 18].

Сероконверсия по HBeAg считается одним из главных показателей успешности лечения HBeAg-позитивного ХГВ, так как сопряжена с улучшением прогноза, нормализацией гистологической структуры печени и повышением «выживаемости» [33]. В связи с низкой частотой развития стойкого ответа после 1 года лечения аналогами нуклеотидов, последующие рекомендации по лечению хронического HBeAg-позитивного вирусного гепатита В касаются удлинения сроков лечения [34, 35].

У больных, получавших комбинированную терапию, частота сероконверсии HBeAg на 48-й неделе терапии составила 32%, против 19% у получавших только ламивудин ($p < 0,001$), обеспечивая меньшую частоту возникновения рецидивов к 24-й неделе наблюдения (13 против 86%, $p < 0,001$).

Одним из неблагоприятных моментов при лечении ламивудином является развитие резистентности на фоне приёма препарата, что влечёт за собой увеличение «вирусной нагрузки» (вирусологический прорыв) и потерю гистологического контроля [31]. Прямым следствием мощного подавления вируса, связанным с применением комбинированной терапии является уменьшение частоты возникновения лекарственной устойчивости к 48-й неделе (7 против 26%, $p < 0,05$).

Большее влияние на подавление вируса (клиренс ДНК HBV к 48-й неделе терапии — 46% против 38%, $p < 0,01$; степень подавления виремии HBV $-6,0$ против $-5,3 \log_{10}$, $p < 0,01$), а также улучшение гистологической активности ткани печени (ГА) (57,0 против 71,0%, $p < 0,01$) доказывает преимущество применения комбинированной противовирусной терапии в лечении HBeAg-позитивных пациентов с ХГВ по сравнению с монотерапией ламивудином.

Заключение

48-недельная комбинированная терапия продемонстрировала лучшую прямую противовирусную активность, чем терапия только ламивудином у HBeAg-позитивных пациентов с ХГВ, а также наименьшую частоту первичной неэффективности лечения, развития резистентности и возникновения рецидивов. При HBeAg-позитивном ХГВ комбинированная терапия индуктором интерферона циклофероном и нуклеотидным аналогом ламивудином хорошо переносится, имеет высокий профиль безопасности и высокую эффективность в сравнении с монотерапией ламивудином.

Синергидный противовирусный эффект комбинированной противовирусной терапии обеспечивается блокированием ДНК-полимеразы HBV (ламивудин) индукцией синтеза интерферонов- α/β , γ , которые связываются со своими клеточными рецепторами, активируя цитоплазматические киназы, индуцирующие антивирусные гены, которые подавляют репликацию вируса с помощью различных механизмов, включая связывание с нуклекапсидом, ингибирование трансляции, деградации ДНК, индукцию апоптоза, оказывая более выраженный подавляющий эффект на синтез HBV ДНК по сравнению с монотерапией ламивудином. Этим объясняется больший процент больных с неопределяемым уровнем ДНК HBV к 48-й неделе терапии в группе пациентов, получавших комбинированную противовирусную терапию;

ЛИТЕРАТУРА

- Lai C.L., Ratziu V., Yuen M.F., Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003; 362: 2089—2094.
- Lok A.S., Heathcot E.J., Hoofnagle J.H. Management of hepatitis B: 2000 — summary of workshop. *Gastroenterology* 2001; 120: 1828—1853.
- Lee W.M. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733—1745.
- Ganem D., Prince A.M. Hepatitis B virus infection — natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118—1129.
- EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009; 50: 227—242.
- Keeffe E.B., Zeuzem S., Koff R.S. et al. Report of an international workshop: roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: in press.
- Liaw Y.F., Leung N., Kao J.H. et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int* 2008; 2: 3: 263—283.
- Lock A.S., McMahon B.J. Chronic Hepatitis B: update 2009. *Hepatology*. 2009; 50(3): 1—36.
- Fattovich G., Rugge M. et al. A randomized controlled trial of lymphoblastoid interferon-alpha in patients with chronic hepatitis B lacking HBeAg. *Hepatology* 1992; 15: 584—589.
- Janssen H.L., van Z.M., Senturk H., Zeuzem S., Acarca U.S., Cakaloglu Y. et al. Pegylated interferon alpha-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomized trial. *Lancet* 2005; 365: 123—129.
- Law G.K., Piratvisuth T., Luo K.X., Marcellin P., Thongsawat S., Cooksley G. et al. Peginterferon alpha-2a, lamivudine, and the combination for the HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682—2695.
- Marcellin P., Lau G.K., Bonino F. et al. Peginterferon alpha-2a alone, lamivudine alone, and two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004; 351, 1206—1217.
- Foldes I., David K., Horvath G. et al. Thyroid dysfunctions in patients with viral hepatitis treated with interferon-alpha. *Orv Heti*. 2004; 145: 23: 1211—1216.
- Kaygusuz I., Ozturk Kaygusuz T., Ozturk A. Effects of interferon-alpha2b on hearing. *Int J Audiol* 2004; 43: 8: 438—441.
- Lai C.L., Chien R.N., Leung N.W., Chang T.T., Guan R. Tai D.I. et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61—68.
- Marcellin P., Chang T.T., Lim S.G., Tong M.J., Sievert W., Shiffman M.L. et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808—816.
- Marcellin P., Heathcote E.J., Buti M., Gane E., de Man R.A., Krastev Z. et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008; 359: 2442—2455.
- Chang T.T., Gish R.G., de Man R., Gadano A., Sollano J., Chao Y.C. et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1001—1010.
- Lai C.L., Gane E., Liaw Y.E., Hsu C.W., Thongsawat S., Wang Y. et al. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2007; 357: 2576—2588.
- Сологуб Т.В., Романцов М.Г., Баранова И.П. и др. Комбинированная терапия хронического вирусного гепатита В, резистентного к лечению ламивудином. *Вест СПбГМА им. И. И. Мечникова* 2006; 2: 7—13.
- Сологуб Т.В., Романцов М.Г., Шульдяков А.А. и др. Комбинированная терапия хронического вирусного гепатита В и её влияние на качество жизни. *Вест СПбГМА им. И. И. Мечникова* 2006; 1.
- Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М.: 1996; 240.
- Радченко В.Г., Стельмах В.В. Козлов В.К. Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С. Руководство для врачей. СПб.: 2004; 168.
- Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Коваленко А.Л., Голубев С. Ю. Иммунодефицитные состояния и коррекция циклофероном: Рук для врачей, СПб.: 1998; 80.
- Стельмах В.В. Возможности интерферониндуцирующей терапии при латентной HBV-инфекции Экспериментальная и клиническая фармакология. СПб.: 2011; 74: 5: 35—39.
- Стельмах В.В. Хронический гепатит В. Вопросы стратегии и тактики профилактики донозологических состояний и заболеваний внутренних органов. Рук для врачей / Под ред. В.Г.Радченко. СПб.: 2011; 271—283.
- Горячева Л. Г., Шилова И. В. Диагностика и лечение вирусных гепатитов В и С у детей раннего возраста. *Врач* 2006; 8: 32—35.
- Стельмах В.В. Морфофункциональное состояние системы мононуклеарных фагоцитов у больных хроническим вирусным гепатитом В и С при проведении этиопатогенетической терапии / Автореф. дис. канд. мед наук. СПб.: 2003.
- Zarubaev V.V., Slita A.V., Krivitskaya V.Z. et al. Direct antiviral effects of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6. *Antiviral Res* 2003; 58: 2: 131—137.
- Ishak K., Baptista A., Bianchi L. et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696—699.
- Dienstag J.L., Goldin R.D., Heathcote E.J. et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 105—117.
- Goodman Z., Dhillon A.P., Wu P.C. et al. Lamivudine treatment reduces progression to cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999; 30: Suppl 1: 59—69.
- Fattovich G., Rugge M., Brollo I. et al. Clinil, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B. *Hepatology* 1986; 6: 167—72.
- Gish R.G., Lok A.S., Chang T.T. et al. Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2007; 133: 5: 1437—1444.
- Leung N.W., Lai C.L., Chang T.T. et al. Extended lamivudine treatment in patient with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33: 1527—1532.

Циклоферон в терапии острых и хронических форм вирусного гепатита С

В. П. МАЛЫЙ, Д. Б. ПЕНЬКОВ, О. И. ЧИРЮКИНА

Харьковская медицинская академия последипломного образования
Харьковская областная клиническая инфекционная больница

Cycloferon Terapy of Acute and Chronic Virus Hepatitis C

V. P. MALYY, D. V. PENKOV, O. I. CHIRYUKINA

Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine
Kharkov Regional Clinical Hospital of Infectious Diseases, Kharkov, Ukraine

На основании проведённого комплексного клинико-лабораторного обследования больных с HCV-инфекцией выявлено, что при применении циклоферона быстрее происходит нормализация клинико-биохимических показателей, а также уменьшение иммунологического дисбаланса по сравнению с применением только базисной терапии. Показан высокий противовирусный эффект препарата. Выявлено положительное влияние циклоферонотерапии на отдалённые последствия гепатита С, что проявляется в увеличении частоты перехода в стадию ремиссии у больных хроническим гепатитом С и уменьшении частоты трансформации острой формы гепатита в хроническую. Доказано усиленное интерфероиндуцирующее и противовирусное действие циклоферона у больных ОГС, а также возможное уменьшение частоты неблагоприятных последствий при назначении препарата в дозе 500 мг.

Ключевые слова: острый гепатит С, хронический гепатит С, интерферон, циклоферон, терапия.

Complex clinical and laboratory examination of patients with HCV infection revealed that the use of cycloferon provided earlier normalization of the clinical and biochemical parameters and lower immunological imbalance vs. the basic therapy alone. High antiviral effect of the drug was shown. There was observed a positive impact of the cycloferon therapy on the late after-effects hepatitis C, evident from higher frequency of the remissions in the patients with chronic hepatitis B and less frequent transformation of the acute form to the chronic one. Higher interferon-inducing and antiviral activities of cycloferon in the patients with acute hepatitis C and possible less frequent unfavourable aftereffects in the therapy with cycloferon in a dose of 500 mg were demonstrated.

Key words: acute hepatitis C, chronic hepatitis C, interferon, cycloferon, therapy.

Проблема вирусных гепатитов с парентеральным механизмом передачи остается одной из наиболее актуальных как в инфекционной патологии, так и в структуре заболеваний печени. Это связано как с широким и повсеместным их распространением, так и с высоким процентом неблагоприятных исходов, основными из которых являются хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома, которые приводят к инвалидизации и смертности [1, 2]. Основой формирования этой группы являются больные вирусным гепатитом С, при котором хронизация патологического процесса в печени отмечается в 75–85% случаев, что более чем в 15 раз превышает аналогичный показатель при гепатите В [3–5].

По оценкам специалистов, вирусом гепатита С в мире инфицировано более 500 млн человек, что

составляет около 10% населения земного шара [6]. По данным американского центра контроля и профилактики заболеваний, у 20–50% больных хроническим гепатитом С (ХГС) развивается цирроз печени, а у 20–30% из них заболевание переходит в гепатоцеллюлярную карциному, требующую для спасения жизни больного пересадки этого органа. По данным ВОЗ, Украина относится к числу стран с умеренным распространением HCV-инфекции, охватывающей от 1 до 2,5% населения [7].

Несмотря на успехи, достигнутые в изучении патогенеза, клиники и диагностики гепатита С, многие вопросы до сих пор остаются нерешёнными. Особые трудности вызывает лечение этого заболевания. С целью повышения эффективности лечения больных с HCV-инфекцией создаются различные препараты как патогенетической, так и этиотропной терапии. Наиболее значительным достижением современной гепатологии следует считать противовирусную терапию и, в частности, интерферонотерапию [8, 9].

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: Харьков, ул. Корчагинцев, 58. ХМАПО

Известно, что полноценность ответной реакции организма на вирусную инфекцию в значительной мере зависит от достаточной продукции интерферона (ИФН), который ограничивает распространение вируса из инфицированных клеток, сокращает период вирусемии, уменьшает тяжесть инфекционного процесса и, в ряде случаев, предотвращает хронизацию. Широко известно его противовирусное, антимикробное, антипролиферативное и иммуномодулирующее действие. Другими словами, контрольно-регуляторные функции ИФН многообразны и направлены на сохранение гомеостаза. Дефицит его определяет уже на первых этапах развития инфекции недостаточность развития защитных реакций организма, что приводит к персистенции возбудителя и формированию затяжных и хронических форм заболевания. Этому способствует и снижение киллерной активности лимфоцитов, за которое также отвечает интерферон [10].

Доказан факт снижения синтеза ИФН при HCV-инфекции, поэтому в терапии этой патологии наибольшую популярность приобрели препараты интерферона- α (стандартного и пегилированного) [11]. Они, оказывая противовирусное и иммуномодулирующее действие, позволяют у определённой части больных предупредить прогрессирование патологического процесса в печени, тем самым частично препятствуя развитию хронического гепатита или отдалённо формируя цирроз печени и гепатоцеллюлярной карциномы [12, 13]. В то же время многомесячные курсы лечения этими препаратами приводят к развитию нежелательных побочных эффектов, до сих пор остаются очень дорогими и далеко не всем доступными. При этом стойкий положительный эффект достигается не более, чем у 30–50% больных [14, 15].

В связи с этим одним из направлений терапии HCV-инфекции является индукция собственного (эндогенного) ИФН с помощью препаратов интерферогенов [16, 17]. Среди индукторов, которые зарекомендовали себя в клинической практике по уровню активности, переносимости и диапазону выявленных положительных эффектов, одно из первых мест занимает циклоферон (НТФФ «Полисан», Санкт-Петербург, Россия) [18, 19]. Это — низкомолекулярный синтетический препарат, относящийся к классу акридонов. В его состав входит синтетический аналог природного алкалоида из культуры *Citrus grandis*. Циклоферон индуцирует синтез преимущественно раннего ИФН- α в макрофагах, нейтрофилах и В-клетках. Он одновременно оказывает этиотропный эффект, действуя на возбудителя, а также патогенетический, стимулируя специфическую и неспецифическую (интерферон) резистентность организма.

Таким образом, циклоферону свойственны классические черты противовирусных препара-

тов и стимуляторов иммунного ответа, что дало возможность использовать его в терапии вирусных гепатитов.

Циклоферон имеет ряд преимуществ перед препаратами экзогенного ИФН:

- прежде всего, это выработка своего собственного ИФН, который в отличие от рекомбинантного не обладает антигенностью (не вызывает формирования антител к эндогенному интерферону, что исключает возможность инактивации последнего);

- при введении циклоферона не отмечаются побочные эффекты, которые могут возникнуть при лечении препаратами экзогенного интерферона, ограничена его потенциальная пирогенность и аллергенность, опасность возникновения аутоиммунных процессов;

- синтез индуцированного ИФН в организме сбалансирован и подвергается контрольно-регуляторным механизмам, обеспечивающим защиту организма от перенасыщения интерфероном;

- циклоферон обладает некоторыми близкими свойствами с экзогенными ИФН и прекрасно сочетается с другими медикаментозными средствами (в том числе рибавирином);

- низкая стоимость препарата позволяет более широко использовать его в терапии больных вирусными гепатитами.

Учитывая изложенное выше, мы использовали циклоферон в лечении больных острыми и хроническими формами вирусного гепатита С.

Материал и методы

Под нашим наблюдением находился 151 больной с HCV-инфекцией. Среди них острый гепатит С (ОГС) установлен у 74 больных, ХГС — у 77. Кроме того, было обследовано 23 практически здоровых пациента, которые составили группу сравнения.

Среди обследованных больных как ОГС, так и ХГС преобладали лица мужского пола (соответственно 62,2 и 75,3%). В возрастном аспекте весомую часть составили лица молодого и среднего возраста от 18 до 40 лет: при ОГС — 60,8%, при ХГС — 77,9%.

У всех больных диагноз и форму заболевания устанавливали на основании клинико-анамнестических, эпидемиологических, лабораторных и инструментальных (ультразвуковое исследование органов брюшной полости) данных. Этиологическую верификацию диагноза осуществляли путём выявления в сыворотке крови специфических серологических маркёров гепатита С: анти-HCV (суммарные), анти-HCV IgG и IgM, анти-HCV core и анти-HCV (NS-3, NS-4, NS-5) методом ИФА. Молекулярно-биологические исследования включали определение репликативной активности HCV на основании выявления в сыворотке крови РНК HCV качественным и количественным методами ПЦР с титрованием генома HCV. Исключение микст-гепатитов осуществляли на основании отрицательных результатов индикации серологических маркёров гепатитов А и В.

ОГС диагностировали при наличии следующих критериев: известный или предположительный контакт с носителем HCV на протяжении предыдущих 2–6 месяцев, повышение активности сывороточной АлАТ в 18–20 и больше раз выше верхней границы нормы, определение в сыворотке крови анти-HCV

IgM и анти-HCV core (при отсутствии или низком титре анти-HCV NS-3, NS-4, NS-5). Клинико-патогенетические варианты течения, форму и степень тяжести острого гепатита определяли согласно общепринятым в клинической практике критериям.

Диагноз ХГ устанавливали соответственно современной международной классификации болезней печени.

Для оценки влияния циклоферонотерапии все больные были распределены на группы.

Среди пациентов с ОГС основную группу составили 49 больных, которым в комплексной терапии назначался циклоферон. Из них 21 больной (I группа) получал препарат в дозе 250 мг в/в или в/м по общепринятой схеме (на 1-й, 2-й, 4-й, 6-й, 8-й, 11-й, 14-й, 17-й, 20-й и 23-й день от начала лечения) тремя курсами с интервалом 7–10 дней, а 28 больных (II группа) — в дозе 500 мг по той же схеме. Контрольную группу составили 25 больных с ОГС, которым назначалась только базисная терапия. По возрасту, полу, тяжести течения заболевания и генотипам HCV группы были репрезентативные.

Среди пациентов с ХГС основную группу составили 52 больных, которые в комплексной терапии получали циклоферон по 500 мг на 1-й, 2-й, 4-й, 6-й, 8-й, 11-й, 14-й, 17-й, 20-й и 23-й день от начала лечения с последующим лечением до шести месяцев по 500 мг один раз в 5 дней. Контрольную группу составили 25 больных ХГС, которые получали только базисную терапию. Обе группы были репрезентативны по возрасту, полу, тяжести течения заболевания и генотипу HCV.

Базисная терапия определялась формой заболевания и тяжестью состояния больного и включала лечебно-охранительный режим, диетическое питание (стол № 5а или 5 по Певзнеру), поливитамины, антиоксиданты. По показаниям применялись спазмолитики, гепатопротекторы, желчегонные и ферментные средства.

Эффективность проведенной терапии оценивали на основании достижения биохимической (нормализация уровня сывороточной АЛТ) и вирусологической (исчезновение из сыворотки РНК HCV) ремиссии в соответствии с рекомендациями Европейской группы по изучению болезней печени.

Результаты и обсуждение

При изучении клинических проявлений ОГС у 68 (91,9%) больных диагностирована легкая и только у 6 (8,1%) — среднетяжелая форма болезни. Заболевание, как правило, начиналось постепенно (85,1% больных). Наиболее частыми вариантами преджелтушного периода были астеновегетативный (у 25,7%) и диспепсический (у 20,3%), а также их сочетание (у 18,9% больных). Продолжительность преджелтушного периода составила в среднем $4,7 \pm 0,9$ дней. Желтуха отмечалась у 94,6% больных. Желтушный период протекал с умеренно выраженным синдромом интоксикации. Среди клинических симптомов чаще всего наблюдались общая слабость (в 75,7% случаев), снижение аппетита (59,5%), тяжесть и боль при пальпации в эпигастрии и правом подреберье (соответственно у 54 и 46,8% больных), тошнота у 24,3% больных. Гепатомегалия определялась у всех больных, а в 16,2% случаев она сочеталась со спленомегалией.

Среди больных с ХГС в 19,5% случаев в анамнезе были указания на перенесенный ранее ОГС. У 80,5% больных диагностирован первично-хронический ГС. Продолжительность заболевания в среднем составила $2,8 \pm 0,8$ лет. У всех больных установлена манифестная форма ХГС.

Клиническая картина при ХГС была малоспецифична и неопределенна. Наиболее часто больные предъявляли жалобы на общую слабость (в 72,7% случаев). Характерными были также проявления диспепсического синдрома в виде снижения аппетита (у 29,9%), чувство тяжести и боли при пальпации в эпигастрии и правом подреберье (соответственно в 71,4 и 53,2% случаев). Основным объективным признаком хронического гепатита являлась гепатомегалия с уплотнением консистенции печени, нередко в сочетании со спленомегалией (у 37,7% больных). Желтуха у этой группы больных выявлялась редко в 19,5% случаев и была выражена незначительно.

При оценке биохимических показателей у больных с ОГС выявлено повышение уровня общего билирубина в сыворотке крови преимущественно за счет его прямой фракции (соответственно $82,8 \pm 7,0$ и $48,6 \pm 4,8$ мкмоль/л). Активность АЛТ в 18–20 раз превышала нормальные показатели. У больных с ХГС отмечалось менее значительное повышение АЛТ (в 5–6 раз выше нормы), средний уровень общего билирубина составил $21,0 \pm 1,45$ мкмоль/л. Изменения в протеинограмме в виде умеренной диспротеинемии определялись в основном у больных с ХГ.

Анализ основных клинико-биохимических показателей в динамике у больных с HCV-инфекцией позволил утверждать, что назначение циклоферона положительно влияло на течение заболевания. Так, при применении препарата у больных с ОГС продолжительность всех основных клинических симптомов в среднем сократилась в 2,0–2,5 раза, а продолжительность желтушного периода — в среднем на 4 дня по сравнению с показателями у больных контрольной группы ($p < 0,05$). Кроме того, отмечалось уменьшение размеров печени в среднем на 3,5 дня раньше у больных основных групп в сравнении с контрольной ($p < 0,05$). Причем уже к окончанию курса циклоферонотерапии нормализация размеров печени отмечалась у 52,3% больных I группы, у 57% больных II группы и лишь у 28% больных контрольной группы. В конечном итоге достоверно уменьшались сроки стационарного лечения на 4 дня у больных, которые получали циклоферон в дозе 250 мг, и на 5,9 дней — в дозе 500 мг.

У больных с ОГС, которые получали циклоферон в разных дозах, уже на второй неделе от начала лечения уровень общего билирубина и его прямой фракции практически достиг нормы: $25,3 \pm 2,2$ и $9,0 \pm 1,7$ мкмоль/л соответственно в I группе, а также $20,5 \pm 1,2$ и $7,7 \pm 1,3$ мкмоль/л — во II группе, тогда как в контрольной группе эти показатели были достоверно выше ($34,3 \pm 4,2$ и $15,1 \pm 2,7$ мкмоль/л соответственно). Активность АЛТ после первого курса циклоферонотерапии снизилась в среднем у больных I группы в 13,5 раз, во II группе — в 11,6 раз, а в контрольной —

только в 4,4 раза ($p<0,05$). Кроме того, нормализация уровня АлАТ за этот период отмечалась у 66,7% пациентов I группы, у 71,4% — во II группе и лишь у 36% больных контрольной группы. После окончания лечения активность АлАТ в контрольной группе оставалась повышенной и составила $1,6 \pm 0,2$ ммоль/л · ч, в то время как в I и II группах больных она достигла соответственно $0,86 \pm 0,1$ и $0,84 \pm 0,1$ ммоль/л · ч ($p<0,05$). Нормализация уровня АлАТ отмечалась у 80,9% больных I группы, у 85,4% — во II группе и только у 52% пациентов контрольной группы.

У больных с ХГС также отмечено положительное влияние циклоферона на течение заболевания. Продолжительность основных клинических симптомов была короче в среднем в 1,5–2,0 раза у пациентов основной группы в сравнении с контрольной ($p<0,05$). Кроме того, у 48,5% больных, которые получали циклоферон, имела место тенденция к уменьшению размеров и плотности печени, тогда как при базисной терапии — только у 23,6% больных. В конечном итоге достоверно уменьшались сроки стационарного лечения на 5 дней у больных основной группы.

У больных с ХГС уже через месяц от начала лечения циклофероном уровень АлАТ снизился в среднем в 4,1 раза и составил $0,9 \pm 0,1$ ммоль/л · ч, тогда как у больных, которые получали только базисную терапию, этот показатель снизился лишь в 1,9 раза и составил $1,8 \pm 0,3$ ммоль/л · ч ($p<0,05$). Следует отметить, что за данный период времени уровень АлАТ нормализовался у 61,5% больных основной группы и у 32% — контрольной ($p<0,05$). После окончания курса лечения активность АлАТ в контрольной группе оставалась повышенной и составила $1,5 \pm 0,2$ ммоль/л · ч, в то время как в основной группе она достигла $0,8 \pm 0,1$ ммоль/л · ч ($p<0,05$). В итоге при лечении циклофероном первичная ремиссия имела место у 73,1% больных с ХГС, а при базисной терапии она отмечалась в 52% случаев ($p<0,05$).

При изучении показателей протеинограммы положительная динамика отмечалась в основном у больных с ХГС, которые получали циклоферон. Выявлено достоверное снижение показателя γ -глобулина с $23,7 \pm 0,8\%$ до $17,2 \pm 1,0\%$, а также повышение уровня альбумина с $53,8 \pm 1,0\%$ до $61,4 \pm 1,1\%$ и показателя альбумино-глобулинового коэффициента с $1,3 \pm 0,04$ до $1,7 \pm 0,07$ ($p<0,05$).

Одним из объективных критериев эффективности лечения циклофероном больных с ГС была положительная динамика уровня ИФН- α в сыворотке крови. Изучение данного показателя проведено у 119 больных с HCV-инфекцией, среди которых у 64 лиц диагностирован ОГС, а у 55 — ХГС.

При ОГС у всех обследуемых больных уровень ИФН- α до начала лечения был достоверно ниже ($p<0,05$) нормы (показатель практически

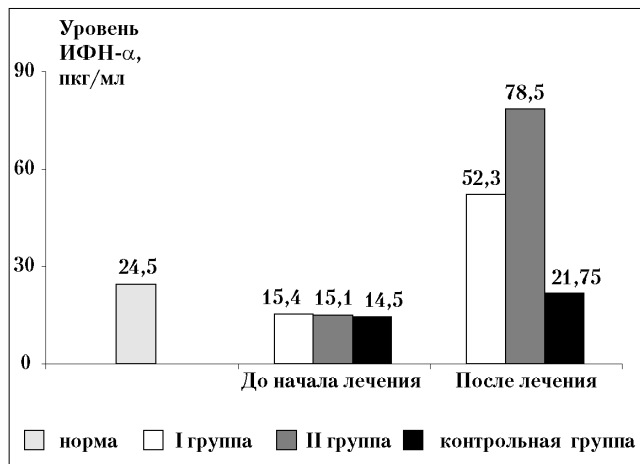


Рис. 1. Динамика уровня ИФН- α в сыворотке крови больных ОГС.

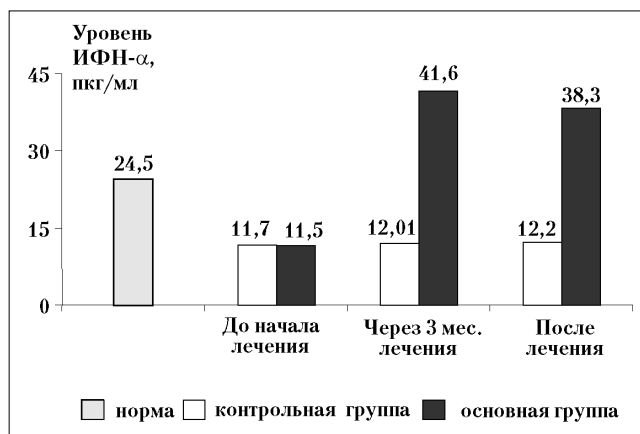


Рис. 2. Динамика уровня ИФН- α в сыворотке крови больных ХГС.

здоровых лиц) и в среднем составил $14,96 \pm 2,06$ пкг/мл (рис. 1). Терапия циклофероном у этих больных способствовала достоверному повышению уровня сывороточного ИФН- α по сравнению с уровнем до начала лечения (в среднем в 3,4 раза — в I группе и в 5,2 раза — во II группе), а также по сравнению с уровнем ИФН- α у пациентов, которые не лечились циклофероном, и у практически здоровых лиц ($p<0,05$). В то же время у пациентов, которые получали только базисную терапию, уровень ИФН- α оставался сниженным ($21,75 \pm 1,04$ пкг/мл) относительно нормы. Кроме того, выявлено более значительное повышение уровня ИФН- α у больных, которые получали циклоферон в дозе 500 мг ($78,5 \pm 3,89$ пкг/мл) по сравнению с таковым у больных, которые лечились в дозе 250 мг ($52,35 \pm 2,76$ пкг/мл) ($p<0,05$).

У больных ХГС основной и контрольной групп до начала лечения уровень сывороточного ИФН- α составил соответственно $11,5 \pm 1,5$ и $11,7 \pm 1,7$ пкг/мл, что достоверно ниже ($p<0,05$) уровня ИФН- α у практически здоровых лиц (рис. 2).

В процессе лечения циклофероном отмечено повышение уровня ИФН- α по сравнению с таковым до начала лечения: $41,6 \pm 3,4$ пкг/мл через 3 месяца от начала лечения и $38,3 \pm 2,9$ пкг/мл — через 6 месяцев ($p < 0,05$).

Указанные показатели были достоверно выше, чем у больных контрольной группы и по сравнению с нормой ($p < 0,05$). У пациентов, которые получали базисную терапию, уровень ИФН- α в динамике практически не изменился.

Процесс повышения уровня ИФН- α свидетельствует о том, что положительный клинический эффект циклоферона в значительной мере связан с активизацией системы эндогенного интерферона.

Известно, что от состояния иммунной системы макроорганизма зависят течение и исходы заболевания. В связи с этим целесообразно изучение иммунного статуса у больных HCV-инфекцией и характера его изменений под влиянием циклоферонотерапии.

Изучение показателей клеточного иммунитета проведено у 115 больных HCV-инфекцией, среди которых у 60 больных был диагностирован ОГС и у 55 — ХГС.

До начала лечения у больных ОГС наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение относительного числа лимфоцитов, которые экспрессируют антигены CD3+, CD4+, CD56+, а также иммунорегуляторного индекса (ИРИ) по сравнению с нормой. Кроме того, выявлено достоверное повышение процента CD8+-лимфоцитов ($p < 0,05$). Указанные изменения свидетельствуют о сниженной иммунологической резистентности организма, что способствует персистенции HCV и хронизации патологического процесса в печени.

На фоне лечения циклофероном содержание субпопуляций CD3+, CD4+, CD56+-лимфоцитов и показатель ИРИ повышались, а количество CD8+-лимфоцитов, наоборот, снижалось, достигая достоверных различий ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем и приближаясь к показателям нормы. В контрольной группе существенных изменений указанных показателей отмечено не было. При сопоставлении этих показателей в I и II группах достоверных различий между ними не выявлено.

У больных ХГС до начала лечения также отмечалась вторичная иммунологическая недостаточность, которая характеризовалась достоверным ($p < 0,05$) снижением количества лимфоцитов, которые экспрессируют антигены CD3+, CD4+, CD56+ и ИРИ по сравнению с показателями практически здоровых лиц. Кроме того, выявлено достоверное ($p < 0,05$) повышение В-лимфоцитов (CD20).

Через 3 месяца от начала лечения циклофероном наблюдалось достоверное повышение субпо-

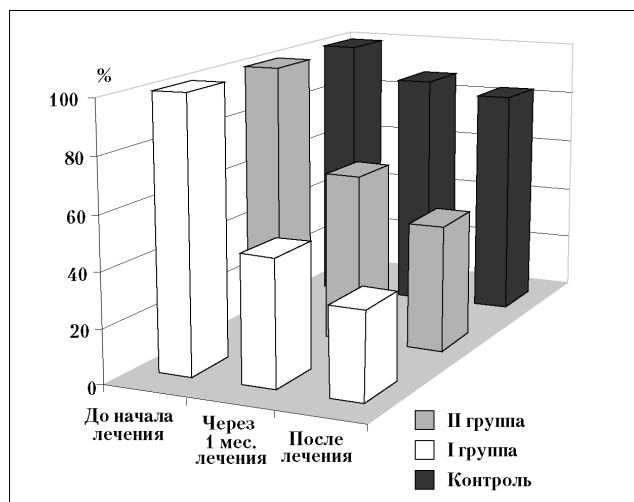


Рис. 3. Частота выявления РНК-НСV в динамике у больных ОГС, %.

пуляций CD3+, CD4+, CD56+-лимфоцитов, а также ИРИ по сравнению с показателями до лечения ($p < 0,05$). Кроме того, указанные показатели были достоверно выше, чем у больных контрольной группы ($p < 0,05$). Однако сохранялось достоверное отличие от нормальных значений уровней большинства иммунокомпетентных клеток, которое свидетельствовало о сохранении иммунологической недостаточности. После окончания циклоферонотерапии указанные показатели приближались к показателям нормы. Экспрессия CD20+ на лимфоцитах достоверно снизилась у пациентов, которые получали циклоферон, и имела тенденцию к снижению у лиц контрольной группы. Однако этот показатель и в основной, и в контрольной группах оставался несколько повышенным по сравнению с показателем у практически здоровых лиц.

Таким образом, при HCV-инфекции выявлена вторичная иммунологическая недостаточность, о чём свидетельствует снижение содержания основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови (CD3+, CD4+, CD56+), а также ИРИ. Терапия циклофероном, в отличие от лечения только патогенетическими и симптоматическими методами, приводила к уменьшению иммунологического дисбаланса, что подтверждает значительное иммуномодулирующее действие препарата.

Основной целью противовирусной терапии, как известно, является угнетение активной репликации вируса в организме. Проведённый нами контроль за динамикой РНК HCV с помощью ПЦР позволил наиболее полно и надёжно охарактеризовать ход инфекционного процесса и объективно оценить эффективность противовирусной терапии. У всех больных до лечения ПЦР была положительной.

У больных ОГС через месяц от начала лечения циклофероном репликативная активность вируса в группах I и II определялась соответственно в 62,0 и 46,4% случаев (рис. 3).

В то же время в контрольной группе РНК HCV определялась у 88% больных ($p < 0,05$).

После окончания трёхмесячного курса лечения циклофероном количество больных, у которых определялась РНК HCV, уменьшилось и составило 47,7% в I группе и 32,2% во II. В контрольной группе РНК HCV сохранялась у 84% больных ($p < 0,05$). Сравнивая показатели в I и II группах, можно отметить, что при использовании циклоферона в дозе 500 мг количество больных, у которых РНК HCV в крови не регистрировалась, была существенным образом выше — 67,8% по сравнению с 52,3% больных, которые лечились циклофероном в дозе 250 мг ($p < 0,05$).

У больных ХГС терапия циклофероном также приводила к прекращению репликации вируса ГС (рис. 4). Так, через месяц от начала лечения препаратом отсутствие РНК HCV зарегистрирована у 21,2% больных, через 3 месяца — у 32,7%, через 6 месяцев — у 46,2% больных ХГС. В то же время в группе больных, которые не лечились циклофероном, вирусемия сохранялась у всех пациентов.

Учитывая то, что ИФН- α и естественные киллеры (CD56) являются одними из важнейших факторов противовирусной резистентности организма и то, что циклоферон обладает, с одной стороны, интерферониндуцирующим, а с другой стороны — иммуномодулирующим действием, была проведена корреляция между уровнем ИФН- α , количеством естественных киллеров и наличием РНК HCV. В результате после завершения лечения циклофероном при ОГС выявлена выраженная прямая корреляционная связь между уровнем ИФН- α и количеством CD56+—лимфоцитов ($r = 0,745$, $p < 0,01$). Кроме того, установлена выраженная обратная корреляционная связь между уровнем ИФН- α и наличием РНК HCV в сыворотке крови ($r = -0,753$, $p < 0,01$), а также между количеством CD56+—лимфоцитов и наличием РНК HCV ($r = -0,782$, $p < 0,01$).

При ХГС также выявлена выраженная прямая корреляционная связь между уровнем ИФН- α и количеством естественных киллеров ($r = 0,718$, $p < 0,01$). Наряду с этим установлена выраженная обратная корреляционная связь между уровнем ИФН- α и наличием РНК HCV ($r = -0,721$, $p < 0,01$) и умеренная обратная корреляция между количеством CD56+—лимфоцитов и РНК HCV ($r = -0,679$, $p < 0,01$).

Полученная прямая корреляция подтверждает иммунокорригирующее действие циклоферона, а обратная — позволяет расценивать противовирусное действие препарата как опосредствованное.

С целью изучения отдалённых результатов циклоферонотерапии проведено наблюдение за

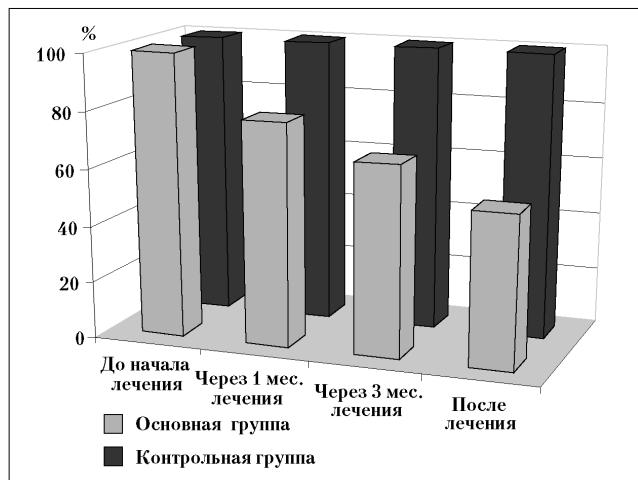


Рис. 4. Частота выявления РНК HCV в динамике у больных ХГС в зависимости от терапии, %.

больными с острыми и хроническими формами ГС на протяжении 12 месяцев после окончания курса лечения.

Анализ репликативной активности при ОГС показал, что максимальная элиминация РНК HCV из крови отмечена после окончания лечения циклофероном и составила 52,3% случаев в I группе и 67,8% — во II группе. За этот же промежуток времени количество РНК HCV-отрицательных пациентов в контрольной группе составило 16,0%. На протяжении 12 месяцев после окончания циклоферонотерапии у данных больных, как основных, так и контрольной групп, отмечалось возобновление репликативной активности в 27,2% случаев в I группе, в 26,3% — во II группе и в 50,0% случаев — в контрольной. Таким образом, общее количество РНК HCV-положительных пациентов в обследуемых группах больных составило 61,9, 50,0 и 92,0% соответственно.

В процессе наблюдения с учётом репликативной и цитолитической активности была выявлена трансформация острого гепатита в хронический у 92,0% больных контрольной группы и у 55,1% больных, которые получали циклоферон ($p < 0,05$). HCV-пастинфекция (нормализация уровня АЛТ и элиминация РНК HCV) была констатирована соответственно в 8,0 и 44,9% случаев ($p < 0,05$). Следует отметить, что при сравнительном анализе указанных процессов в основных группах HCV-пастинфекция чаще диагностирована у пациентов, которые получали циклоферон в дозе 500 мг — у 50% больных по сравнению с 38,1% больных, которые получали его в дозе 250 мг ($p < 0,05$).

Анализ результатов наблюдения больных, у которых отмечалась хронизация процесса, с учётом гипераминотрансфераземии показал, что манифестная форма ХГ отмечалась у 44,0% больных, которые получали только базисную

терапию, что было значительно чаще ($p<0,05$), чем у больных, которые лечились циклофероном (в I группе — 19%, во II — 17,8%).

Анализ циклоферотерапии по биохимическим показателям эффективности у больных ХГС показал, что стабильная ремиссия отмечена у 59,6% больных основной группы. Это выше, чем у пациентов контрольной группы, в которой стабильная ремиссия зафиксирована только в 28,0% случаев ($p<0,05$). Рецидивы чаще возникали у больных, которые получали только базисную терапию — в 24,0% случаев по сравнению с 13,5% — в основной группе ($p<0,05$).

Изучение репликативной активности при ХГС позволило зафиксировать максимальную реверсию РНК HCV в конце курса циклоферотерапии, что составило 46,2% случаев. На протяжении 12 месяцев после окончания лечения у 33,3% больных с ранее отрицательной РНК HCV

отмечено возобновление репликативной активности, и частота выявления РНК HCV составила 69,2% случаев. Итак, полная ремиссия с нормализацией уровня АЛАТ и прекращением репликации вируса имела место у 30,8% больных основной группы, в то время, как в контрольной группе полная ремиссия не регистрировалась.

В целом следует отметить, что применение циклоферона в комплексной терапии больных ОГС и ХГС оказалось эффективным, о чем свидетельствовали клинические, биохимические, иммунологические и молекулярно-биологические данные. При этом имело место как противовирусное, так и достаточно выраженное иммуномодулирующее действие. Таким образом, назначение циклоферона является патогенетически обоснованным и позволяет расширить возможности современной терапии больных с HCV-инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубовская О.А. Возможности применения человеческого лейкоцитарного интерферона в лечении хронического гепатита С. *Клин инфектол паразитол* 2012; 2: 02: 24—30.
2. Жданов К.В., Козлов К.В., Сукачев В.С. Эволюция противовирусной терапии хронических гепатитов В, С и D. *Журнал инфектологии* 2009; 1: 4: 23—35.
3. Вовк А.Д. Проблема лікування хворих на хронічні гепатити. Вирусні гепатити з парентеральним механізмом передачі збудителя і їх исходи. Київ, 2001; 244—248.
4. Голубовская О.А. Вирусные гепатиты: проблемы и перспективы. *Туберкулез. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція* 2011; 4: 07: 83—87.
5. Малый В.П., Звягинцева Т.Д., Титовский С.П. HCV-инфекция (острая и хроническая) клинико-патогенетические и терапевтические аспекты. Київ, 2005; 291.
6. Sy T., Jamal M.M. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3: 41—46.
7. Федорченко С.В. Хроническая HCV-инфекция. Київ: ВСИ Медицина, 2010; 272.
8. Balan V. et al. A phase I/II study evaluating escalating doses of recombinant human albumin-interferon-alpha fusion protein in chronic hepatitis C patients who have failed previous interferon-alpha-based therapy. *Antivir Ther* 2006; 11: 35—45.
9. Nomura H. et al. Short-term interferon-alpha therapy for acute hepatitis C: a randomized controlled trial. *Hepatology* 2004; 39: 1213—1219.
10. Balint E. et al. Therapy-induced antibodies against the antiviral and antiproliferative effects of interferons in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2004; 51: 359—369.
11. Павлова Л.Е., Макашова В.В., Токмалаев А.К. Система интерферона при вирусных гепатитах. *Эпидемиол инфекц бол* 2000; 1: 48—51.
12. Блохина Н.П. Нові стратегії інтерферотерапії хворих на хронічний гепатит С. *Інфекційні хвороби*. 2000; 2: 5—13.
13. Halota W., Pawlowska M., Andrejczyn M. Interferony alfa w leczeniu przewlekłych zakażeń HCV. *Przegl Epidemiol* 2004; 58: 405—411.
14. Benci A., Caremani M., Tacconi D. Thrombocytopenia in patients with HCV-positive chronic hepatitis: efficacy of leukocyte interferon-alpha treatment. *Int J Clin Pract* 2003; 57: 17—19.
15. Malaguarnera M. et al. Intravenous immunoglobulin plus interferon-alpha in autoimmune hepatitis C. *Biodrugs* 2004; 18: 63—70.
16. Андрейчин М.А. Вирусні гепатити: Лекція. Тернопіль: Укрмедкнига, 2001; 52.
17. Еришов Ф.И., Тазулахова Э.Б. Индукторы интерферона — новое поколение иммуномодуляторов. *Вестник РАМН* 1999; 4: 52—56.
18. Руденко А.А., Вовк А.Д., Боброва И.А. и др. Циклоферон в лечении заболеваний инфекционной природы. *Метод рекомендации*. Киев, 2000; 24.
19. Сологуб Т.В., Горячева Л.Г. и др. Эколого-эпидемиологические, патогенетические аспекты вирусных гепатитов и принципы эффективной безопасной терапии. *Пособие для врачей*. М.: 2004; 56.

Использование органических растворителей для определения показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях, нерастворимых в воде

О. В. ШАПОВАЛОВА, Г. В. ДОЛГОВА, Н. П. НЕУГODOVA, Г. А. САПОЖНИКОВА

Испытательный Центр экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва

Organic Solvents for Determination of Bacterial Endotoxin Index in Water-Insoluble Pharmaceutical Substances

O. V. SHAPOVALOVA, G. V. DOLGOVA, N. P. NEUGODOVA, G. A. SAPOZHNIKOVA

Scientific Centre for Expertise of Medical Application Products, Moscow

Субстанции, предназначенные для изготовления парентеральных лекарственных форм, необходимо контролировать по показателю «Бактериальные эндотоксины» (БЭ) с помощью ЛАЛ-теста. Проведённое исследование направлено на определение возможности применения органических растворителей для определения БЭ с помощью гель-тромб теста в случае использования водонерастворимых фармацевтических субстанций. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что этиловый спирт практически не влияет на активность эндотоксина и при осуществлении рутинных анализов целесообразно испытывать растворы субстанций, в которых концентрация спирта ниже 6%.

Ключевые слова: водонерастворимые фармацевтические субстанции, бактериальные эндотоксины, этиловый спирт.

Substances for manufacture of parenteral drugs require control by the «Bacterial Endotoxin» (BE) index with the LAL-test. The aim of the study was to show possible applicability of organic solvents in BE determination by the gel-thromb test in case of water-insoluble pharmaceutical substances. The results confirmed that ethyl alcohol practically had no effect on the endotoxin activity. In the routine assays it is advisable to test solutions of the substances at the alcohol concentration of 6% below.

Key words: water-insoluble pharmaceutical substances, bacterial endotoxins, ethyl alcohol.

Субстанции, предназначенные для изготовления парентеральных лекарственных форм, следует контролировать по показателю «Бактериальные эндотоксины» с помощью ЛАЛ-теста. При этом они должны проверяться в том виде, в котором будут использоваться в производстве готовых лекарственных форм.

Фармацевтические субстанции обладают рядом характеристик, которые необходимо учитывать при определении наличия бактериальных эндотоксинов (БЭ), например: содержание активного вещества и влаги, pH готового раствора и пр. Растворимость субстанций имеет определяющее значение для испытания по показателю «Бактериальные эндотоксины»: в случае, если субстанция нерастворима в воде, то для оценки её качества необходимо подобрать соответствующий растворитель и подтвердить возможность его применения в опыте.

Обычно для растворения водонерастворимых субстанций используют органические растворители, кислоты или щелочи, но для того, чтобы рекомендовать конкретный растворитель, необходимо выяснить степень его влияния на ферментативную реакцию ЛАЛ-реактива и активность эндотоксинов.

Проведённое исследование направлено на определение возможности применения органических растворителей для определения БЭ с помощью гель-тромб теста в случае использования водонерастворимых фармацевтических субстанций.

Материал и методы

В экспериментах использовали набор реактивов фирмы «Associates of CAPE COD, Inc.»: ЛАЛ-реактив с чувствительностью (λ) 0,03 ЕЭ/мл (lot# 509-01-497), контрольный стандарт эндотоксина без наполнителя (КСЭ; lot# 117) [1].

Работу проводили в соответствии с требованиями разделов ОФС «Бактериальные эндотоксины» — «Мешающие факторы» и «Количественный анализ» [2].

Объектами данного исследования выбраны растворители, наиболее часто применяемые в ЛАЛ-тесте: этиловый спирт 96%, диметилформамид, диметилсульфоксид.

© Коллектив авторов, 2013

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

Таблица 1. Определение бактериальных эндотоксинов в ряду последовательных разведений этилового спирта с помощью метода ЛАЛ-теста — «Количественный анализ» (ОФС 42-0062-07)

Этиловый спирт	Повтор- ность №	Фактор разведения						Контроли	
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	положи- тельный	отрица- тельный
Испытуемый растворитель	1	—	—	—	—	—	—		
	2	—	—	—	—	—	—		
Положительный контроль испытуемого растворителя	1	—	—	—	—	+	+	++	---
	2	—	—	—	—	+	+	++	---

Примечание. Здесь и в табл. 2–8: обозначение конечного результата гель-тромб теста: «+» — наличие геля; «—» — отсутствие геля.

Таблица 2. Определение бактериальных эндотоксинов в ряду последовательных разведений диметилформамида с помощью метода ЛАЛ-теста — «Количественный анализ» (ОФС 42-0062-07)

Диметилформамид	Повтор- ность №	Фактор разведения						Контроли	
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	положи- тельный	отрица- тельный
Испытуемый растворитель	1	—	—	—	—	—	—		
	2	—	—	—	—	—	—		
Положительный контроль испытуемого растворителя	1	—	—	—	—	+	+	++	---
	2	—	—	—	—	+	+	++	---

Таблица 3. Определение бактериальных эндотоксинов в ряду последовательных разведений диметилсульфоксида с помощью метода ЛАЛ-теста — «Количественный анализ» (ОФС 42-0062-07)

Диметилсульфоксид	Повтор- ность №	Фактор разведения						Контроли	
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	положи- тельный	отрица- тельный
Испытуемый растворитель	1	—	—	—	—	—	—		
	2	—	—	—	—	—	—		
Положительный контроль испытуемого растворителя	1	—	—	—	+	+	+	++	---
	2	—	—	—	+	+	+	++	---

Результаты исследования

Экспериментальная часть.

I. Этап. Определение степени разведения растворителя водой для ЛАЛ-теста, в которой он не ингибирует реакцию гелеобразования. Исследуемые органические растворители без разбавления ингибируют реакцию гелеобразования ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами. Однако по мере их разведения водой для ЛАЛ-теста концентрация снижается и вместе с тем уменьшается ингибирующее действие.

Растворители разводили водой для ЛАЛ-теста и готовили два параллельных ряда последовательных двукратных разведений. Одновременно, для контроля ингибирования готовили такие же два параллельных ряда разведений с концентрацией КСЭ 2 в каждом испытуемом растворе.

В проведённом эксперименте были получены следующие результаты:

- испытуемые растворы этилового спирта 96%, начиная с разведения 1:16, не ингибировали реакцию ЛАЛ-реактива с КСЭ (табл. 1).
- испытуемые растворы диметилформамида, начиная с разведения 1:64, не ингибировали реакцию ЛАЛ-реактива с КСЭ (табл. 2).
- испытуемые растворы диметилсульфоксида, начиная с разведения 1:32 не ингибировали реакцию ЛАЛ-реактива с КСЭ (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оценка качества растворов исследуемых растворителей в гель-тромб тесте возможна, начиная с разведения этилового спирта водой для ЛАЛ-теста в 16 раз, диметилформамида — в 64 раза, диметилсульфоксида — в 32 раза.

Таким образом, можно сделать вывод, что использование разбавленных органических растворителей не препятствует образованию гель-тромба.

II. Этап. Исследование влияния растворителя на активность бактериальных эндотоксинов. Если для растворения фармацевтических субстанций используется органический растворитель, то нельзя исключить вероятность его влияния на структуру и активность ЛАЛ-реактива, состоящего из липополисахарида. Поэтому, в процессе растворения и подготовки образца к анализу, возможно, разрушение БЭ в испытуемой субстанции. В итоге велик риск получения ложноотрицательных результатов, которые будут свидетельствовать об отсутствии эндотоксинов [3].

Для исключения подобной ситуации проводили «модельный» опыт с использованием КСЭ. В качестве загрязненной эндотоксинами субстанции использовали контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ) активностью 2500 ЕЭ во флаконе.

Во флакон с КСЭ добавляли по 5 мл каждого из органических растворителей таким образом, чтобы теоретическое содержание БЭ составляло 500 ЕЭ в 1 мл растворителя. Дальнейшие разведения основного раствора КСЭ готовили с помощью воды для ЛАЛ-теста. Реальное содержание БЭ в испытуемых растворах определяли в опыте «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» [2]. Параллельно проводили контрольный опыт, в котором содержимое аналогичного флакона КСЭ (той же серии) растворяли в воде для ЛАЛ-теста. Схема разведений приведена в табл. 4.

Готовые растворы стандарта эндотоксина с концентрациями, начиная с 4 ЕЭ/мл (128λ) до 0,0075 ЕЭ/мл (λ/4) анализировали в ЛАЛ-тесте.

В опытах были получены следующие результаты (табл. 5—8).

Результаты, приведённые в таблицах 5—8, подтверждают, что в условиях эксперимента чувствительность ЛАЛ-реактива — 0,03 ЕЭ/мл, определённая с КСЭ в разведении на воде для

Таблица 4. Схема разведения растворов контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ)

№№	Органический растворитель или вода для ЛАЛ-теста	Концентрация БЭ в растворе
1	Во флакон с КСЭ (2500 ЕЭ) добавляли 5 мл исследуемого растворителя или воды для ЛАЛ-теста	500 ЕЭ/мл
2	0,2 мл раствора (1) + 0,8 мл воды для ЛАЛ-теста	100 ЕЭ/мл
3	0,1 мл раствора (2) + 0,9 мл воды для ЛАЛ-теста	10 ЕЭ/мл (320 λ)
4	0,5 мл раствора (3) + 0,75 мл воды для ЛАЛ-теста	4 ЕЭ/мл (128 λ)
5	0,5 мл раствора (4) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	2 ЕЭ/мл (64 λ)
6	0,5 мл раствора (5) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	1 ЕЭ/мл (32 λ)
7	0,5 мл раствора (6) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,5 ЕЭ/мл (16 λ)
8	0,5 мл раствора (7) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,25 ЕЭ/мл (8 λ)
9	0,5 мл раствора (8) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,125 ЕЭ/мл (4 λ)
10	0,5 мл раствора (9) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,06 ЕЭ/мл (2 λ)
11	0,5 мл раствора (10) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,03 ЕЭ/мл (λ)
12	0,5 мл раствора (11) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,015 ЕЭ/мл (λ/2)
13	0,5 мл раствора (12) + 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста	0,0075 ЕЭ/мл (λ/4)

Таблица 5. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на воде для ЛАЛ-теста

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на воде для ЛАЛ-теста										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл	0,03 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—

Таблица 6. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на спирте этиловом 96%

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на спирте этиловом										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл	0,035 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	0,03 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	0,06 ЕЭ/мл		—

Таблица 7. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на диметилформамиде

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на диметилформамиде										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	0,24 ЕЭ/мл	0,339 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	0,24 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—

Таблица 8. Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (0,03 ЕЭ/мл) с использованием КСЭ, исходный раствор которого приготовлен на диметилсульфоксиде

№ ряда	Концентрация БЭ исходного раствора КСЭ, приготовленного на диметилсульфоксиде										Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Геометрическое среднее значений концентрации эндотоксина	Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)
	128λ	64λ	32λ	16λ	8λ	4λ	2λ	λ	0,5λ	0,25λ			
1	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	0,24 ЕЭ/мл	0,404 ЕЭ/мл	—
2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—
3	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—
4	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0,48 ЕЭ/мл		—

Таблица 9. Перечень водонерастворимых субстанций, исследуемых по показателю «Бактериальные эндотоксины» с помощью гель-тромб теста

Наименование субстанции	Растворимость	Формулировка раздела «Бактериальные эндотоксины»
Липовая кислота (тиоктовая кислота)	Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96% и хлороформе.	Предельное содержание не более 0,29 ЕЭ на 1 мг субстанции. Для проведения анализа готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 25 мг липовой кислоты в 1 мл этилового спирта 96%, а затем разводят его не менее чем в 100 раз.
Медроксипрогестерона ацетат	Легко растворим в метилхлориде, умеренно растворим в спирте этиловом 96%, растворим в ацетоне и диоксане, практически нерастворим в воде.	Предельное содержание не более 0,35 ЕЭ на 1 мг медроксипрогестерона ацетата. Для проведения анализа готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 100 мг медроксипрогестерона ацетата в 1 мл этилового спирта 96%. Полученную суспензию перемешивают на вихревой мешалке каждые 10 минут на протяжении 1 часа. Испытания проводят с разведением исходного раствора не менее чем в 200 раз.
Паклитаксел	Растворим в хлороформе, спирте метиловом, спирте этиловом абсолютном, умеренно растворим в спирте 96%, практически нерастворим в воде.	Предельное содержание не более 3,0 ЕЭ на 1 мг паклитаксела. Для проведения анализа готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 10 мг паклитаксела в 1 мл этилового спирта 96%. Полученную суспензию перемешивают на вихревой мешалке каждые 10 минут на протяжении 1 часа до полного растворения субстанции. Испытания проводят с разведением исходного раствора не менее чем в 500 раз.
Рифампицин	Практически нерастворим в воде, трудно растворим в формамиде, мало растворим в этиловом спирте.	Предельное содержание не более 0,5 ЕЭ на 1 мг рифампицина (ГФ XII). Субстанцию растворяют в спирте этиловом 96% при постоянном перемешивании для получения исходного раствора с концентрацией 5 мг рифампицина в 1 мл. Для проведения анализа исходный раствор разводят водой для ЛАЛ-теста не менее чем в 40 раз.

ЛАЛ-теста, по величине совпадает с его заявленной чувствительностью. Значение чувствительности ЛАЛ-реактива, определённое с КСЭ, исходный раствор которого был приготовлен на растворе этилового спирта 96%, равнялось 0,035 ЕЭ/мл, то есть менее чем в два раза отличалось от заявленной чувствительности — 0,03 ЕЭ/мл (см. табл. 6).

Данные, приведённые в таблицах 7 и 8, свидетельствуют о том, что при исходном растворении КСЭ на диметилформамиде и диметилсульфоксиде, чувствительность ЛАЛ-реактива отличается от заявленной величины в 11,3 и 13,5 раза соответственно.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что этиловый спирт практически не влияет на активность эндотоксина. Таким образом, можно сделать вывод, что этиловый спирт 96% в качестве растворителя водонерастворимых субстанций не оказывает разрушающего действия на БЭ и при осуществлении рутинных анализов целесообразно испытывать растворы субстанций, в которых концентрация спирта ниже 6%, то есть в разведении 1:16 или больше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сертификат на реактивы фирмы Associates of CAPE COD, Inc.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации, ГФ XII, 1: 128—136.
3. Тутнова А. Д., Демидова В. В., Шаповалова О. В., Долгова Г. В. ЛАЛ-тест. М.: 2007; 4—19.

В качестве подтверждения проведённых исследований при определении бактериальных эндотоксинов методом гель-тромб теста для субстанций нерастворимых в воде был использован этиловый спирт 96%.

В лаборатории фармакологии разработаны и валидированы методики для проектов нормативных документов для раздела «Бактериальные эндотоксины» на такие фармацевтические субстанции как «Липовая кислота», «Медроксипрогестерона ацетат», «Паклитаксел», «Рифампицин» (табл. 9).

На основании проведённых исследований считаем возможным использовать этиловый спирт 96% в качестве растворителя для субстанций нерастворимых в воде в опытах гель-тромб теста. Использование концентрированных органических растворителей, таких как диметилформамид и диметилсульфоксид, недопустимо, так как они приводят к разрушению КСЭ или уменьшению его биологической активности.

Подтверждение качества, безопасности и эффективности биологических лекарственных препаратов при изменении технологии их производства

А. Н. ВАСИЛЬЕВ, Е. В. ГАВРИШИНА, Р. Р. НИЯЗОВ, А. А. СНЕГИРЕВА, В. К. АДОНИН

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

Demonstration of Quality, Safety and Efficacy of Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process

A. N. VASILIEV, E. V. GAVRISHINA, R. R. NIYAZOV, A. A. SNEGIREVA, V. K. ADONIN

Scientific Centre for Expertise of Medical Application Products, Moscow

Обеспечение качества, безопасности и эффективности лекарственных препаратов, поступающих в оборот России, является одним из приоритетных направлений, требующих государственного контроля и надзора. При изменении технологии производства биологических лекарственных препаратов возникает необходимость подтверждения отсутствия влияния на безопасность и эффективность, выражающегося в сопоставимости препаратов до и после изменения. В связи с отсутствием необходимого правового регулирования как никогда актуальна необходимость гармонизации существующего российского законодательства, подходов к пред- и пострегистрационной разработке и экспертизе биологических лекарственных препаратов с международным опытом обеспечения их качества, безопасности и эффективности.

Ключевые слова: биологические лекарственные препараты, сопоставимость, доклинические и клинические исследования, изменение технологии производства, изменение процесса производства, биоаналоги.

Ensuring quality, safety and efficacy of the medicinal products placed on the market of the Russian Federation constitutes the area that requires strict regulation. When changes are made to the manufacturing process, the manufacturer generally needs to evaluate the relevant quality attributes of the product to demonstrate that modifications did not occur that would adversely impact the safety and efficacy of the drug. Where there is the lack of a sound legal basis, there is a need in harmonization of current Russian legislation with international and European rules governing medicinal product for human use to ensure quality, safety and efficacy thereof.

Key words: biological medicinal products, comparability, pre-clinical and clinical trials, manufacturing process, changes in manufacturing process, biosimilars.

Введение

Производители биологических лекарственных препаратов часто сталкиваются с необходимостью изменения процесса производства лекарственных средств. Изменения вносятся на различных этапах как в ходе разработки, так и после государственной регистрации. Причиной таких изменений могут служить: усовершенствование процесса производства, увеличение масштаба производства, повышение стабильности лекарственного средства и соответствие изменённым регуляторным требованиям [1]. При изменении процесса производства производители, как правило, изучают соответствующие показатели качества фармацевтической субстанции и (или) готового препарата, чтобы подтвердить, что изменения не оказывают неблагоприятного

влияния на безопасность и эффективность. Однако могут потребоваться дополнительные исследования (доклинические, клинические и фармаконадзорные) [1]. При высокой аналогичности показателей качества до и после изменений процесса производства и отсутствии нежелательного влияния на безопасность и (или) эффективность, включая иммуногенность, производитель делает вывод о сопоставимости между исходным и изменённым препаратом.

В настоящее время до 10% объёма мирового фармацевтического рынка приходится на биотехнологические препараты; их доля постоянно увеличивается и, по оценке ряда специалистов, к 2015 г. может достичь 50% [2–4]. Сегодня уже более 150 биотехнологических лекарственных препаратов (84 белка) широко применяются для лечения больных во всем мире. Это интерфероны, эритропоэтины, моноклональные антитела, инсулины, низкомолекулярные гепарины, гормон роста человека, коло-

© Коллектив авторов, 2013

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

ниестимулирующий фактор, факторы свертывания крови, тромболитики [5—7]. Однако на сегодняшний день под определение биологического лекарственного препарата подпадают не только биотехнологические, но и другие лекарственные препараты, полученные из биологических источников, например, гепарины, панкреатины, прочие нерекombинантные фармацевтические субстанции [8].

В настоящее время формальные подходы к подтверждению сопоставимости по качеству, безопасности и эффективности биотехнологических/биологических лекарственных препаратов, подвергшихся изменению технологии их производства, в Российской Федерации отсутствуют. Поэтому гармонизация существующих подходов к пред- и пострегистрационной разработке и экспертизе биологических лекарственных препаратов с международным опытом обеспечения их качества, безопасности и эффективности является первоочередной задачей.

Законодательная регламентация

В Федеральном законе от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (далее — Закон) порядок внесения изменений в регистрационное досье биологических препаратов, а равно как и определение биологических препаратов не приводится. В статье 30 Закона приводится краткий порядок внесения изменений в регистрационное досье всех лекарственных препаратов, но отсутствуют нормы, обязывающие владельцев регистрационных удостоверений вносить их [9].

В противоположность этому, статьей 23 Директивы 2001/83/ЕС (являющейся основополагающим нормативно-правовым актом, регулирующим обращение лекарственных препаратов в ЕС) четко регламентируется обязанность владельца регистрационного удостоверения вносить изменения в регистрационное досье [10]:

1. После регистрации владелец регистрационного удостоверения в отношении методов производства и контроля... должен принимать во внимание научный и технический прогресс и вносить изменения, которые могут потребоваться в целях соответствия производства и контроля общепринятым научным методам.

Такие изменения должны утверждаться уполномоченным органом заинтересованной страны-члена.

2. Владелец регистрационного удостоверения обязан немедленно сообщать национальному уполномоченному органу обо всех новых сведениях, которые могут потребовать изменения документов и данных, содержащихся в регистрационном досье.

Внесение изменений в регистрационное досье подробно урегулировано Постановлением Ко-

миссии (ЕС) № 1234/2008 от 24 ноября 2008 г. об экспертизе изменений условий регистрации лекарственных препаратов для медицинского и ветеринарного применения с изменениями [11, 12] и подзаконных актов, принятых в его развитие [13]. Следует отметить, что все изменения технологии производства биологического лекарственного средства (как фармацевтической субстанции, так и готового препарата) относятся в ЕС к изменениям II типа, т.е. изменениям, способным значительно повлиять на качество, безопасность или эффективность лекарственного препарата. Подобные изменения всегда требуют проведения сравнительных испытаний, а иногда и доклинических и клинических исследований [1, 11, 13].

Причина необходимости широкомасштабных испытаний и исследований

Биологические лекарственные средства имеют сложное молекулярное строение (рекомбинантная ДНК, иммунологические средства, лекарственные препараты, полученные из крови или плазмы, генная и клеточная терапия и др.), они заведомо более сложны по строению, чем большинство лекарственных препаратов, содержащих фармацевтические субстанции, полученные с помощью химического синтеза. Биологические субстанции характеризуются трёхмерной структурой, множеством кислотно-основных вариантов, посттрансляционными модификациями (например, гликозилизацией) и т. п., которые играют важную роль в реализации их биологических функций. Изменение процесса производства биологических препаратов может, в числе прочего, привнести изменения в эти характеристики. Первоначально они могут рассматриваться как незначимые или даже не обнаруживаться на этапе аналитических и биологических испытаний, однако впоследствии эти изменения могут повлиять на профиль безопасности и эффективности биологических лекарственных препаратов, подвергшихся изменению технологии их производства [14—18].

Само определение биологического препарата подразумевает проведение более сложных, по сравнению с веществами, полученными путём химического синтеза, испытаний [10]: *биологический лекарственный препарат — это лекарственный препарат, содержащий биологическую фармацевтическую субстанцию. Биологическая фармацевтическая субстанция — это субстанция, продуцируемая биологическим источником или получаемая из него, требующая проведения комплекса физико-химических и биологических испытаний в целях описания её свойств, подтверждения и контроля качества, а также процесса её производства и его контроля.*

Таблица 1. Виды изменений биологических лекарственных препаратов

Фармацевтическая субстанция	
1. Изменение производителя исходного материала/реактива/промежуточного продукта, используемого в процессе производства фармацевтической субстанции, или изменение производителя фармацевтической субстанции (включая площадки выпускающего контроля качества) фармацевтической субстанции	8. Изменение параметров спецификации и (или) критериев приемлемости первичной упаковки фармацевтической субстанции
2. Изменения процесса производства фармацевтической субстанции	9. Изменение аналитической методики испытания первичной упаковки фармацевтической субстанции
3. Изменение размера серии (включая диапазоны размера серии) фармацевтической субстанции или промежуточного продукта	10. Изменение периода повторного испытания/периода хранения или условий хранения фармацевтической субстанции
4. Изменение внутрипроизводственных испытаний или критериев приемлемости, используемых при производстве фармацевтической субстанции	11. Введение нового проектного поля или расширение одобренного проектного поля фармацевтической субстанции
5. Изменение параметров спецификации и (или) критериев приемлемости фармацевтической субстанции, исходного материала/промежуточного продукта/реактива, используемых в процессе производства фармацевтической субстанции	12. Введение пострегистрационного протокола управления изменениями, затрагивающими фармацевтическую субстанцию
6. Изменение аналитической методики испытания фармацевтической субстанции или исходного материала/промежуточного продукта/реактива, используемых в процессе производства фармацевтической субстанции	13. Изменение внутрипроизводственных испытаний или критериев приемлемости, используемых при производстве фармацевтической субстанции
7. Изменение первичной упаковки фармацевтической субстанции	
Вспомогательные вещества	
1. Изменение состава (вспомогательных веществ) готового препарата	4. Изменение аналитической методики испытания вспомогательного вещества
2. Изменение концентрации однодозового, полностью вводимого парентерального препарата при неизменности содержания фармацевтической субстанции на единицу дозы (т.е. дозировки)	5. Изменение источника вспомогательного вещества или реактива с риском трансмиссивной губчатой энцефалопатии
3. Изменение параметров спецификации и (или) критериев приемлемости вспомогательного вещества	6. Изменение синтеза или получения нефармакопейного вспомогательного вещества (если описан в регистрационном досье)
Готовый препарат	
1. Замена или добавление новой производственной площадки для части или всех процессов производства готового препарата;	8. Изменение аналитической методики испытания первичной упаковки готового препарата
2. Изменение соглашений о выпуске серий и контроля качества готового препарата	9. Изменение формы или размеров контейнера или укупорки (первичной упаковки)
3. Изменение размера серии (включая диапазоны размера серии) готового препарата	10. Изменение размера упаковки готового препарата
4. Изменение параметров спецификации и (или) критериев приемлемости готового препарата	11. Изменение поставщика компонентов упаковки или устройства (если указано в досье)
5. Изменение аналитической методики испытания готового препарата	12. Изменение срока годности или условий хранения готового препарата
6. Изменение первичной упаковки готового препарата	13. Введение пострегистрационного протокола управления изменениями
7. Изменение параметров спецификации и (или) критериев приемлемости первичной упаковки готового препарата	14. Изменение процесса производства готового препарата

Виды и этапы изменений

В Руководстве по подробной категоризации изменений, вносимых в условия регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения и лекарственных препаратов для ветеринарного применения [13], описаны различные изменения, которым может подвергаться биологический лекарственный препарат на различных этапах его производства (табл. 1).

Сопоставимость и стратегия её подтверждения

Сопоставимость — это понятие, относящееся, в первую очередь, к клиническим свойствам ле-

карственного препарата. Несмотря на неизбежную некоторую вариацию показателей качества, отсутствие клинически значимых различий между двумя препаратами позволяет сделать вывод, что они сопоставимы. Сопоставимость — это важная концепция, применяемая в отношении всех лекарственных препаратов (биологических, биоаналогов, препаратов, полученных химическим путём). При этом сопоставимость лекарственных препаратов, фармацевтическая субстанция которых получена химическим путём, именуется биоэквивалентностью. Этот вывод можно сделать, исходя из определений биоэквивалентности, данных в законодательстве зарубежных стран [10, 19, 20].

В целях определения влияния изменений технологии производства на клинические свойства биологического препарата необходимо провести тщательный анализ всех предполагаемых последствий такого изменения. Проводя такой анализ, производитель должен выбрать определённые критерии, позволяющие задать границы высокоаналогичному лекарственному средству, подвергнутому изменению технологии производства. Необходимо, как правило, собрать данные по качеству лекарственного средства до и после изменения технологии производства, затем провести сравнение, заключающееся в объединении и анализе всех имеющихся данных, например, стандартного анализа серий, внутрипроизводственного контроля, валидации/оценки процесса производства, описания свойств и стабильности. Сравнение результатов с заранее оговорёнными критериями должно позволить объективно оценить, сопоставимы ли свойства лекарственного препарата до и после изменения технологии производства. Все полученные данные необходимо изложить и представить в регуляторный орган в виде досье на изменение.

После анализа показателей качества производитель может столкнуться с одной из следующих ситуаций [1]:

- основываясь на надлежащем сравнении значимых показателей качества, лекарственное средство до и после изменений высокоаналогично и считается сопоставимым, т. е. нежелательного влияния на профили безопасности и эффективности не прогнозируется;
- несмотря на то что лекарственное средство до и после изменений кажется высокоаналогичным, использованных аналитических методик для выявления значимых различий, которые могут повлиять на безопасность и эффективность лекарственного средства, недостаточно. Производитель должен провести дополнительные испытания (например, более подробное описание свойств) или доклинические и (или) клинические исследования, чтобы прийти к однозначному заключению;
- несмотря на то что лекарственное средство до и после изменений кажется высокоаналогичным, обнаружены некоторые различия между показателями качества лекарственного средства до и после изменений, однако можно обосновать, что нежелательного влияния на профили безопасности или эффективности не ожидается (основываясь на накопленном опыте производителя, значимых сведениях и данных). В этом случае лекарственное средство до и после изменений можно считать сопоставимым;
- несмотря на то что лекарственное средство до и после изменений кажется высокоаналогичным, обнаружены некоторые различия между показателями качества лекарственного средства

до и после изменений: не исключено возможное нежелательное влияние на профили безопасности и эффективности. В этом случае сбор и анализ дополнительных данных о показателях качества, скорее всего, не позволит установить сопоставимость лекарственного средства до и после изменений. Производитель должен провести доклинические и (или) клинические исследования;

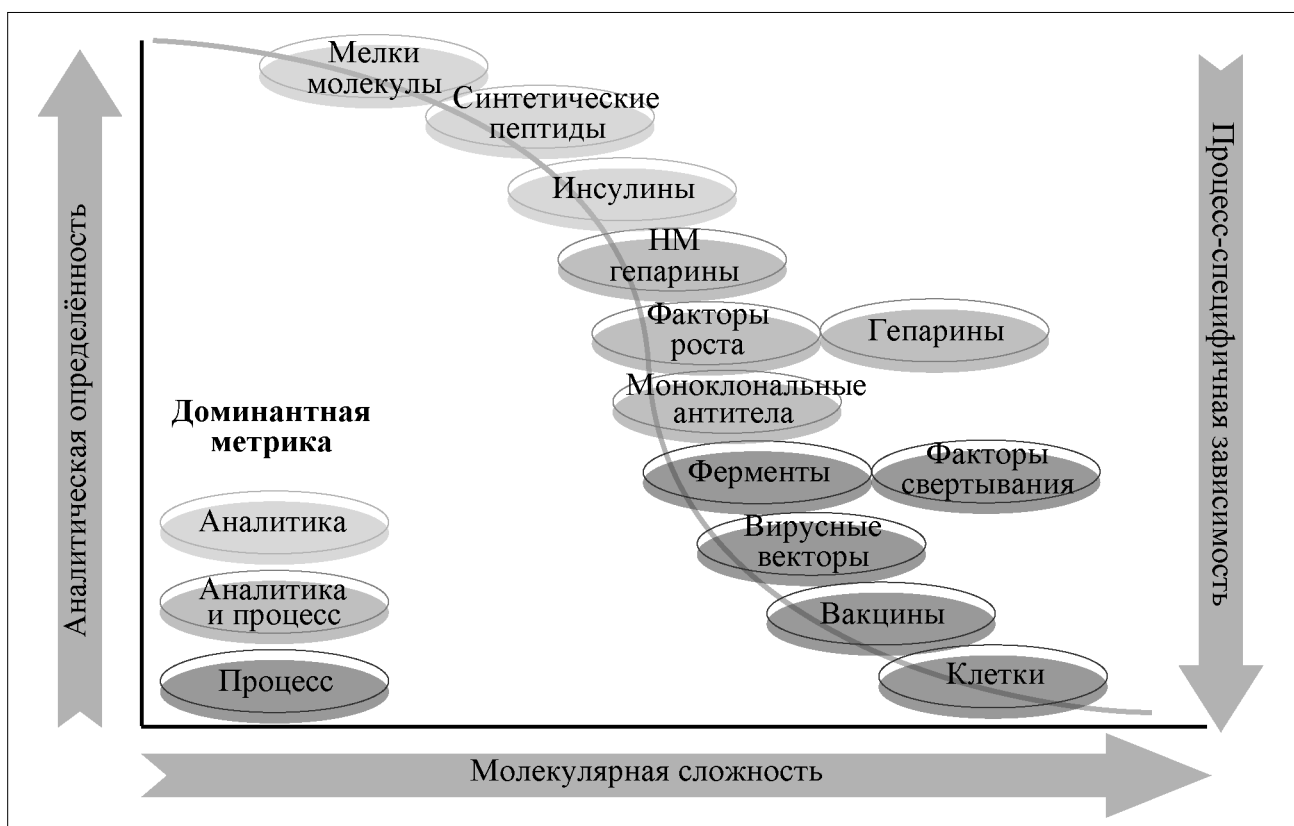
- различия между показателями качества столь значительны, что лекарственные средства не являются высокоаналогичными и, таким образом, не сопоставимы. Такой результат требует иного подхода.

Объём данных, необходимых для анализа и обоснования необходимости проведения тех или иных исследований в рамках проведения подтверждения сопоставимости зависит от сложности строения молекулы лекарственного препарата. Для лекарственных препаратов с малым размером молекулы, как правило, достаточно подтверждения параметров качества путём проведения аналитических испытаний. По мере увеличения размеров молекулы лекарственного препарата растёт набор необходимых испытаний для подтверждения сопоставимости, при этом на первый план выходит обеспечение однородности и воспроизводимости процесса производства, тогда как аналитические возможности надлежащего описания свойств таких препаратов снижаются (рисунок) [21]. На рисунке показано, что чем крупнее молекула, тем сложнее она поддается аналитическому описанию (тем больше требуется различных аналитических испытаний); основой обеспечения качества сложных лекарственных препаратов является однородный и воспроизводимый процесс производства, который в регистрационном досье должен быть исчерпывающе описан.

Требования к исследованию сравнительной эффективности и безопасности зависят от этапа разработки, вида произведённого изменения и его влияния на показатели качества. Производители часто осуществляют изменения в ходе разработки лекарственного препарата до его государственной регистрации. Если изменение производства произошло до подтверждающего(их) исследования(ий), необходимость в представлении дополнительных данных исследований сопоставимости может быть меньшей, чем в случае изменений, осуществлённых по завершении подтверждающего(их) исследования(ий) или после государственной регистрации (табл. 2) [1, 17].

Требования к объёму исследований сопоставимости

В целях обеспечения качества, безопасности и эффективности лекарственного препарата, по-



Зависимость объёма исследований от сложности строения молекулы биологического препарата.

Таблица 2. Объём исследований в зависимости от этапа разработки, на котором вносятся изменения

Этап изменений	Необходимый объём данных
Изменения процесса производства до начала подтверждающих исследований	В целях подтверждения, что имеющиеся доклинические и клинические данные, полученные до изменения, остаются действительными и возможна их экстраполяция на изменённый лекарственный препарат, как правило, достаточно представить соответствующие результаты физико-химических и биологических (<i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>) и, в некоторых случаях, также доклинических или клинических исследований сопоставимости, например, фармакокинетического исследования с однократным введением.
Изменения процесса производства в ходе подтверждающих клинических исследований	Не рекомендуется осуществлять изменения в ходе подтверждающего исследования; в противном случае заявителю следует обратиться за научной консультацией.
Изменения процесса производства по завершении подтверждающих исследований или после государственной регистрации	Если изменение производства происходит по завершении подтверждающего(их) исследования(ий) или после государственной регистрации, как правило, требуются более глубокие исследования сопоставимости, включая физико-химические и биологические исследования <i>in vitro</i> и, возможно, клинические фармакокинетические и (или) фармакодинамические исследования сопоставимости. Если результаты таких исследований сопоставимости не исключают влияния на профиль эффективности и безопасности лекарственного препарата, может(гут) потребоваться дополнительное(ые) клиническое(ие) исследование(я).

лучаемого с помощью изменённого процесса производства, проводятся исследования сопоставимости. Это достигается за счёт сбора и анализа соответствующих данных, направленных на выявление всякого нежелательного влияния на лекарственный препарат, обусловленного изменением процесса производства. Как и при подтверждении биоаналогичности, при подтверждении сопоставимости при внесении изме-

нений в процесс производства биологических ЛП необходимо выбрать препарат сравнения [18].

Если препарат оригинальный, то препаратом сравнения является серия оригинального препарата, произведённая до реализации изменения технологии производства [1], независимо от этапа разработки. Если лекарственный препарат является биоаналогом, то препаратом сравнения на предрегистрационном этапе может являться се-

рия биоаналога, произведённая до реализации изменения. Если же изменение произведено после государственной регистрации, то единственным возможным препаратом сравнения может служить оригинальный препарат [22].

Подтверждение сопоставимости необязательно должно выражаться в идентичности показателей качества лекарственного средства до и после внесения изменений, однако они должны быть высокоаналогичны (схожи), а текущих знаний должно быть достаточно для обеспечения отсутствия нежелательного влияния на безопасность и эффективность лекарственного препарата, обусловленного какими-либо различиями в показателях качества.

Изучение сопоставимости основывается на комбинации результатов комплекса аналитических и биологических испытаний, а в некоторых случаях и доклинических и клинических данных. Если производитель в силах подтвердить сопоставимость исключительно по результатам аналитических исследований, то доклинические и клинические исследования с изменённым лекарственным средством не требуются. Однако, *если зависимость показателей безопасности и эффективности от отдельных показателей качества не установлена* и по результатам аналитических испытаний выявлены различия в показателях качества лекарственного средства до и после изменений, то исследования сопоставимости могут потребовать дополнительного изучения качества и проведения доклинических и (или) клинических исследований.

При проведении исследований сопоставимости и оценке характеристики препарата определяют молекулярную структуру, подлинность, чистоту, иммунохимические свойства, специфическую биологическую активность, подтверждают отсутствие контаминирующих агентов и оценивают стабильность препарата. Поскольку биологические препараты производятся в живых системах или выделяются из биологического материала, в готовом препарате возможно присутствие антител, полисахаридов, полинуклеотидов и вирусного материала [23]. По этой причине необходимо проведение надлежащих испытаний на биологическую нагрузку и (или) вирусную безопасность изменённого банка клеток и клеток с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro*.

Описание свойств (*characterization*) препарата, как правило, охватывает оценку более широкого диапазона показателей качества по сравнению с диапазоном показателей, включённых в спецификацию (нормативную документацию) фармацевтической субстанции или готового препарата, и требует более широкого и сложного набора используемых аналитических методов [1,

24]. Это обусловлено тем, что спецификация (в России этим документом является нормативная документация) является инструментом контроля качества, а не документом, всесторонне описывающим фармацевтические и биологические свойства препарата [25]. Однако в результате изменения технологии производства могут образоваться новые свойства, которые неуловимы с помощью методик, включённых в спецификацию (нормативную документацию).

На выбор доклинических и клинических исследований влияют свойства лекарственного средства, т. е. необходимо выбрать такую стратегию исследований сопоставимости, которая наилучшим образом с достаточной точностью позволяет спрогнозировать и обнаружить клинически значимые различия.

Вид и объём таких исследований может различаться и зависит от ряда факторов, относящихся к фармацевтической субстанции и лекарственному препарату, например [1]:

- знаний о молекуле и прочих молекулах того же класса;
- этапа разработки ещё незарегистрированных лекарственных препаратов;
- результатов физико-химических и биологических исследований сопоставимости;
- предлагаемого клинического применения.

Подтверждение сопоставимости — процесс последовательный, начинающийся с исследований качества (ограниченных или всесторонних) и подкрепляемый, при необходимости, доклиническими, клиническими и (или) фармаконадзорными исследованиями. Если заявителю с помощью физико-химических и биологических исследований удастся обосновать сопоставимость, то проводить доклинические или клинические исследования с изменённым лекарственным препаратом не требуется.

Разработка, планирование объёма исследований и экспертиза их результатов должны основываться на следующих принципах:

- сравнительность;
- ортогональность: сравнительные испытания одного и того же показателя, например, подлинности, должны проводиться с помощью методов, основанных на различных физико-химических и (или) биологических принципах, (например, пептидное картирование и изоэлектрофокусирование);
- последовательность: качество, доклинические и клинические исследования;
- чем сложнее строение, тем больше исследований;
- объём исследований на каждом этапе зависит от степени биоаналогичности, подтвержденной на предыдущих этапах.

Вопросы подтверждения качества. Подтверждение качества при изменении технологии производства многомерно и заключается в следующем:

- соответствии производства принципам и руководствам по надлежащей производственной практике [26];
- соответствии процесса производства целевому назначению — валидация и (или) оценка процесса [27, 28];
- соответствии фармацевтической субстанции и готового препарата целевому назначению — обеспечение фармацевтического (фармакопейного) качества;
- обеспечении сопоставимости между фармацевтической субстанцией и готовым препаратом, произведённым до изменения технологии производства, с таковыми после изменения — исследования сопоставимости.

В целях максимального выявления значимых различий в показателях качества лекарственного средства, которые могут возникнуть вследствие изменения процесса производства, необходимо тщательно подобрать и оптимизировать набор испытаний, проводимых в рамках исследований сопоставимости. Чтобы изучить весь диапазон физико-химических свойств и биологической активности целесообразно использовать, по меньшей мере, два аналитических метода для каждого показателя качества (например, молекулярную массу, примеси, вторичные/третичные структуры при изучении подлинности) — принцип ортогональности [1, 25]. То есть в целях получения данных об одном и том же параметре каждый метод должен основываться на различных физико-химических или биологических принципах, что позволит максимизировать обнаружение различий в свойствах лекарственного средства до и после изменения процесса производства.

Описание свойств биологических/биотехнологических лекарственных средств с помощью соответствующих методов включает определение физико-химических свойств, биологической активности, иммунохимических свойств (при их наличии), чистоты, примесей, контаминантов и пр.

Важно отметить, что для удовлетворительного анализа влияния изменений производственного процесса одних испытаний и аналитических методик, отобранных для составления **спецификации** (в России эквивалентом является **нормативная документация, НД**) фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, как правило, недостаточно, поскольку цель их выбор заключается в стандартном контроле качества лекарственного средства, а не полного его описания. Производители должны подтвердить, что спецификации после изменения процесса производства продолжают обеспечивать качество лекарственного средства. Результаты, укладываемые в

установленные критерии приемлемости, но не укладываемые в ранее наблюдаемые тенденции контроля производства, могут свидетельствовать о различиях между лекарственными средствами, произведённым с помощью старого и нового процессов, и потребовать дополнительного исследования или анализа. Если данные указывают на то, что предыдущее испытание более не подходит для стандартного анализа серий лекарственного средства после изменения технологии его производства, может потребоваться модификация, исключение или добавление испытания в спецификацию.

При определённых изменениях процесса производства, даже небольшие его модификации могут вызвать изменения стабильности изменённого лекарственного препарата. Необходимо изучить каждое изменение, обладающее способностью повлиять на структуру белка или чистоту и профиль примесей, с точки зрения влияния на стабильность, поскольку белки зачастую восприимчивы к изменениям. Более того, исследования стабильности должны обладать способностью обнаруживать незначительные различия, которые невозможно с лёгкостью обнаружить в исследованиях по описанию свойств.

В соответствии с Европейским опытом, при внесении изменений в процесс производства фармацевтической биологической субстанции лекарственных средств проводится сравнительная экспертиза качества, позволяющая подтвердить, что биологические субстанции, как и готовые препараты, обладают высокой аналогичностью по показателям качества до и после изменений процесса производства, и что нежелательного влияния на безопасность или эффективность, включая иммуногенность, лекарственного препарата не отмечается. Затем по результатам анализа показателей качества, так же как и в случае готового биологического препарата, принимается решение о необходимости или об отсутствии необходимости проведения подтверждающих доклинических или клинических исследований [14, 15]. В связи с этим в отношении биологических фармацевтических субстанций процедура Главного файла фармацевтической субстанции (Active substance master files) [29], эквивалентная в России внесению фармацевтической субстанции в государственный реестр лекарственных средств, не распространяется [30].

Применительно к Российской Федерации считаем целесообразным не включать биологические фармацевтические субстанции в государственный реестр, а при изменении технологии производства уже внесённых в государственный реестр фармацевтических субстанций проводить испытания и исследования в соответствии с принципами, изложенными в настоящей статье, в том числе с готовым препаратом.

Кроме того, согласно европейскому законодательству замена биологической фармацевтической субстанции на другую, с несколько изменённой молекулярной структурой при отсутствии существенных различий по эффективности и (или) безопасности (за исключением изменений фармацевтической субстанции сезонной, препандемической или пандемической вакцины для профилактики гриппа) в ЕС является изменением, требующим государственной регистрации изменённого лекарственного препарата [11]. Это обусловлено тем, что фармацевтическая субстанция, как и сам препарат, имеет биологическое происхождение и, вследствие её сложности, для описания и установления её качества требуется комбинация физико-химических и биологических испытаний, а также испытание и контроль процесса производства.

Доклинические исследования. Если для установления сопоставимости неизменённого и изменённого лекарственного препарата результатов исключительно физико-химических и биологических испытаний, затрагивающих качество, недостаточно — либо вследствие обнаружения различий между ними, либо вследствие характера изменения производства, не позволяющего исключить различий по результатам изучения качества, результаты доклинических исследований могут выявлять ценные признаки потенциальных различий в эффективности и безопасности.

В одних случаях целесообразно провести небольшое количество доклинических исследований или не проводить их вовсе, однако в других случаях необходимо провести большой объём исследований. Следует отметить, что составление программы надлежащих доклинических исследований требует понимания структуры и активности лекарственного средства. Необходимо учитывать положения соответствующих документов, в частности Руководства по доклинической оценке безопасности лекарственных препаратов, полученных биотехнологическим путём [31]. Изменения профиля примесей необязательно требуют проведения доклинических исследований. Однако владелец регистрационного удостоверения должен обосновать выбранную стратегию [32]. Отсутствие результатов доклинических исследований также требует подробного обоснования [32].

Доклинические исследования должны быть сравнительные и нацелены на выявление различий между реакциями на неизменённый и изменённый лекарственный препарат, а не реакций *per se*. Неизменённый и изменённый лекарственные препараты следует сравнивать в рамках одного исследования.

Учитывая вновь появляющиеся технологии необходимо регулярно пересматривать методы исследования. Например, определённую цен-

ность могут представлять *in vitro* технологии, такие как методики связывания «в реальном времени». В будущем развивающееся учение о геномных/протеомных микропанелях *in vivo* позволит обнаруживать незначительные изменения биологического ответа на фармакологически активные вещества.

В целях выявления каких-либо произошедших изменений в реактивности и обнаружения вероятных(ой) причин(ы) несопоставимости, **используя параллельный сравнительный дизайн** исследования, необходимо с помощью методик, подобных исследованиям связывания с рецептором или клеточным методикам, многие из которых могут быть доступны по результатам изучения качества, **изучить препараты до и после изменения.**

При наличии некоторой неопределённости или опасений относительно фармакокинетических параметров или фармакодинамических эффектов, значимых для клинического применения и (или) безопасности, следует рассмотреть возможность проведения исследований *in vivo* на одном или нескольких видах животных с использованием должным образом валидированных животных моделей. Большую надёжность представляют результаты исследований, проведённых на видах, в отношении которых на неизменённом препарате показано, что они являются подходящими для человека. Вместо чистой фармацевтической субстанции предпочтительно использовать готовую лекарственную форму. В идеале с целью упрощения интерпретации данных состав лекарственного препарата, использованного в доклинических исследованиях сопоставимости, должен совпадать с таковым, использованным в клинических исследованиях.

Клинические исследования. Требования к исследованию сравнительной эффективности и безопасности зависят от этапа разработки, вида произведённого изменения и его влияния на показатели качества. Производители часто осуществляют изменения в ходе разработки лекарственного препарата до его государственной регистрации. Если изменение производства произошло до подтверждающего(их) исследования(й), необходимость в представлении дополнительных данных исследований сопоставимости может быть меньшей, чем в случае изменений, осуществлённых по завершении подтверждающего(их) исследования(й) или после государственной регистрации [32].

Клинические исследования в обоснование сопоставимости могут быть фармакокинетическими, фармакодинамическими и исследованиями эффективности.

Фармакокинетические исследования являются важной частью клинических исследований сопоставимости. Поскольку цель заключается в под-

тверждении сопоставимости, а не описания клинической фармакологии препарата *per se*, такие исследования должны быть сравнительными.

В целом, приемлемо перекрёстное исследование с введением однократной дозы, так как прямому сравнению, как правило, характерна более низкая вариация. Однако необходимо принимать во внимание такие факторы, как: иммуногенность и её возможные последствия на фармакокинетику и (или) фармакодинамику. Более подробно см. Руководство по фармакокинетике терапевтических белков [33].

Фармакодинамику рекомендуется оценивать как часть сравнительного фармакокинетического исследования, поскольку изменения фармакодинамики в некоторых случаях обусловлены изменением кинетики. Исследования, опять же, должны носить сравнительный характер, а не быть направлены на описание фармакодинамики препарата *per se*.

Выбор конечной точки должен обеспечивать достаточную чувствительность, позволяющую обнаружить небольшие различия, достаточную прецизионность измерения и клиническую значимость для целевой популяции. В целях подтверждения аналитической чувствительности необходимо обосновать выбранный диапазон доз. Целесообразно проводить исследования нескольких доз [34], обосновать выбор маркёра(ов), а также заранее установить и обосновать границу эквивалентности. В связи с этим необходимо обосновать выбор популяции исследования. Использование первичных или вторичных фармакодинамических маркёров возможно лишь у пациентов, а не здоровых добровольцев.

Если подходящие маркёры отсутствуют или если с помощью фармакодинамических исследований не удалось чётко подтвердить сопоставимость, необходимо, используя клинические конечные точки, провести **сравнительное клиническое исследование эквивалентности, подтверждающее сопоставимую эффективность**. Исследования, опять же, должны носить сравнительный характер, в которых сопоставляются исследуемый препарат и препарат сравнения. В отношении оригинальных лекарственных препаратов таковыми являются лекарственные препараты до и после внесения изменения [1], в отношении биоаналогов — серия биоаналога после изменения процесса производства и оригинальный препарат [22]. Во избежание систематических ошибок клинические исследования должны, как правило, быть рандомизированными, двойными слепыми. Потенциальные различия в эффективности необходимо изучить в исследованиях с наибольшей вероятностью обнаружения таких различий [34]. При определении размера выборки необходимо руководствоваться не только сооб-

ражениями клинической эффективности, но также быть нацеленным на обнаружение различий в безопасности.

Невзирая на доказанную сопоставимую эффективность, профиль безопасности изменённого препарата может отличаться от неизменённого (или в отношении биоаналога — оригинального препарата) (по характеру, серьёзности или частоте нежелательных реакций). До реализации изменений необходимо получить данные от достаточного количества пациентов, позволяющие сравнить профили нежелательных реакций изменённого и неизменённого препарата. При анализе нежелательных явлений заявитель должен не только отметить частоту их возникновения, но также возможные различия в их клинических проявлениях (продолжительность, тяжесть и серьёзность, обратимость, ответ на лечение и т. д.) и включить в регистрационное досье рассматриваемого лекарственного препарата спецификацию безопасности. Она должна включать описание возможных проблем с безопасностью, обусловленных изменениями процесса производства. Иногда после реализации изменений могут потребоваться дополнительные исследования, например, фармакоэпидемиологические [32].

Требования к составлению досье на изменения

При изменении технологии производства биотехнологических/биологических лекарственных препаратов регуляторная практика всего мира придерживается аксиомы о некачественности, небезопасности, неэффективности лекарственного препарата, произведённого с помощью новой технологии производства [11, 13, 35]. Таким образом, бремя подтверждения отсутствия нежелательного влияния как на качество, так и безопасность и эффективность в связи с изменением технологии производства полностью ложится на владельца регистрационного удостоверения. В ходе научной экспертизы научный орган вправе принять или отклонить представленное обоснование, руководствуясь исключительно научными принципами. Отсутствие обоснования влечёт за собой применение вышеупомянутой аксиомы. Даже если, по мнению экспертов, изменение не влечёт за собой негативного влияния на качество, безопасность и (или) эффективность лекарственного препарата, подвергшегося изменению технологии производства, но при этом владельцем регистрационного удостоверения не представлено обоснование отсутствия такого влияния, изменение признаётся необоснованным.

Поэтому, подобно любому изменению регистрационного досье зарегистрированного лекарственного препарата, внесение изменений в техноло-

гию производства биотехнологических/биологических лекарственных препаратов необходимо сопровождать подробным описанием вносимых изменений, описанием потенциального влияния таких изменений на показатели качества, безопасности и эффективности. Зачастую в предоставляемой документации по качеству отсутствует обоснование выбора методик, их видов и количества, могут быть не полностью описаны физико-химические, фармацевтические и биологические свойства.

Необходимо представить результаты соответствующих сравнительных фармацевтических и биологических испытаний. Необходимо подробно описать данные (включая статистическую обработку результатов) [36] о производстве фармацевтической субстанции и лекарственного препарата (описание процесса, контроль материалов и процессов, валидация процессов производства, разработка процесса производства), о контроле качества фармацевтической субстанции и лекарственного препарата (аналитические методики, валидация аналитических методик, анализы серий, обоснование спецификаций), а также сведения о фармацевтической разработке лекарственного препарата, контроле качества вспомогательных веществ и вирусной безопасности.

В некоторых случаях, описанных выше испытаний недостаточно, и необходимо провести сравнительные доклинические и (или) клинические исследования, подтверждающие отсутствие негативного влияния на качество, безопасность и эффективность лекарственного препарата. Отсутствие результатов сравнительных доклинических и (или) клинических исследований необходимо во всех случаях обосновывать достаточностью проведенных аналитических и биологических испытаний. Научные принципы такого обоснования описаны в документах «Сопоставимость биотехнологических/биологических средств, подвергшихся изменениям процесса производства» (ICH E5) [1] и Руководстве по сопоставимости биотехнологических лекарственных препаратов после изменения процесса производства: доклинические и клинические вопросы [32]. Форму представ-

ления обоснования целесообразно представить в соответствии с Модулем 2 Общего технического документа [37].

Заключение

Отсутствие чётких рекомендаций и нормативно-правовых актов в отношении принципов подтверждения сопоставимости биологических лекарственных препаратов, подвергшихся изменению технологии их производства, значительно осложняет обеспечение удовлетворительного их качества, безопасности и эффективности. Разработка современных, гармонизированных с международным опытом принципов, регламентирующих планирование комплекса исследований сопоставимости, позволит задать чёткие стандарты определения перечня необходимых исследований и составления досье. В связи с чем гармонизация существующих подходов к пред- и пострегистрационной разработке и экспертизе биологических лекарственных препаратов с международным опытом обеспечения их качества, безопасности и эффективности является важной задачей, что хорошо понимается государством и отражено в Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года [38], повторно озвучено заместителем Председателя Правительства Российской Федерации А. В. Дворковичем [39] и учтено в плане научно-исследовательской работы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по теме «Научное обоснование методических подходов к доклиническому и клинико-фармакологическому изучению и экспертной оценке эффективности и безопасности лекарственных средств» [40].

Соблюдение вышеизложенных принципов и рекомендаций позволит сделать исход процедуры внесения изменений в регистрационное досье зарегистрированного биотехнологического/биологического препарата при изменении технологии его производства более предсказуемым и в то же время защитит интересы отдельного пациента и общественного здоровья в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process (Q5E). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf (дата обращения: 17.12.2012).
2. Хасабов Н.Н., Земскова Н.А. Биологические лекарственные средства и их биоаналоги: определение, вопросы качества, идентичности и безопасности. Вестн Росздравнадзора 2008; 6.
3. Белоусов Д.Ю. Биоаналоги — насколько они подобны? Качеств клин практ 2006; 2: 80—83.
4. Шило В.Ю. Биоаналоги в лечении анемии при хронической болезни почек: потенциальная польза или неоправданный риск? Лечащий врач. 2007; 9—10: 56—64.
5. Бредер В.В. Биоаналоги: копии или похожие, но иные лекарства? Мед вест 2007; 26—27: 411—412.
6. Schellekens H. Biosimilar epoetin: how similar are they? Eur J Hosp Pharm 2004; 3: 43—47.
7. Singh A. K. Renal Division, Brigham and Women's hospital & Harvard Medical School, Boston, USA. World Congress of Nephrology, Apr 22, 2007.
8. Overview of Biological Active Substances of Non-Recombinant Origin. Coordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures — Human [официальный сайт]. URL: http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h/_procedural_guidance/Compilation_Biological_Active_Substance_no_n-recombinant_origin.pdf (дата обращения: 20.08.2013).
9. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [Принят Гос. Думой 24 марта 2010 года с изменениями и дополнениями по состоянию на 6 декабря 2011 г.]. Росс газ Федеральный выпуск №5157 от 14 апреля 2010 г. [элек-

- тронный ресурс]. URL: <http://www.rg.ru/2010/04/14/lekarstva-dok.html> (дата обращения: 30.08.2013).
10. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (Consolidated version: 20/01/2011). OJ L 311, 28.11.2001; 67. URL: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83/2001_83_en.pdf (дата обращения: 05.02.2013).
 11. Commission Regulation (EC) No 1234/2008 of 24 November 2008 concerning the examination of variations to the terms of marketing authorisations for medicinal products for human use and veterinary medicinal products. The rules governing medicinal products in the European Union [официальный сайт]. URL: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg_2008_1234/reg_2008_1234_en.pdf (дата обращения: 12.08.2013).
 12. Commission Regulation (EU) No 712/2012 of 3 August 2012 amending Regulation (EC) No 1234/2008 concerning the examination of variations to the terms of marketing authorisations for medicinal products for human use and veterinary medicinal products. The rules governing medicinal products in the European Union [официальный сайт]. URL: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg_2012_712/reg_2012_712_en.pdf (дата обращения: 12.08.2013).
 13. Commission Classification Guideline - Guideline on the details of the various categories of variations to the terms of marketing authorisations for medicinal products for human use and veterinary medicinal products (2010/C 17/01). The rules governing medicinal products in the European Union [официальный сайт]. URL: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/c17_1/c17_1_en.pdf (дата обращения: 12.08.2013).
 14. Comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process - non-clinical and clinical issues (ЕМЕА/СНМР/ВМВР/101695/2006). European Medicines Agency [официальный сайт]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003935.pdf (дата обращения: 08.08.2013).
 15. Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process (Q5E). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf (дата обращения: 17.12.2012).
 16. Авдеева Ж.И., Р.А. Волкова, Н.А. Алпатова и др. Сопоставимость биотехнологических продуктов (субстанции и готового препарата), полученных до и после внесения изменений в процесс производства. Ведом. НЦЭСМП 2013; 2.
 17. Сопоставимость биотехнологических продуктов, полученных до и после внесения изменений в процесс производства. Общие принципы планирования исследований. Методические рекомендации НЦЭСМП, 2011; 28.
 18. Доклинические и клинические исследования биологически аналогичных лекарственных препаратов. Методические рекомендации НЦЭСМП, 2013; 30.
 19. Investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1). European Medicines Agency [официальный сайт]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (дата обращения: 06.08.2013).
 20. Title 21-Food and Drugs, Chapter I-Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Subchapter D--Drugs for Human use. United States Food and Drug Administration [официальный сайт]. URL: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=320.1> (дата обращения: 06.08.2013).
 21. Mattaliano R.J. A PhRMA Member View on Biosimilars: Analytical and Quality Considerations. United States Food and Drug Administration [официальный сайт]. URL: http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drug_s/AdvisoryCommitteeForPharmaceuticalScienceandClinicalPharmacology/UCM315764.pdf (дата обращения: 09.09.2013).
 22. Ответ Европейского агентства по лекарственным средствам на обращение ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 4 сентября 2013 г. Личные коммуникации.
 23. Update on the safety and bioequivalence of biosimilars - focus on enoxaparin. Jeske W, Walenga JM, Hoppensteadt D, Fareed J. Dovepress [электронный ресурс]. URL: <http://www.dovepress.com/update-on-the-safety-and-bioequivalence-of-biosimilars-ndash-focus-on-peer-reviewed-article-DHPS> (дата обращения: 05.09.2013).
 24. Validation of Analytical Procedures Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (дата обращения: 20.08.2013).
 25. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (Q6B). International Conference on Harmonisation [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B_Guideline.pdf (дата обращения: 09.09.2013).
 26. Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. Eudralex Vol. 4: GMP Human & Veterinary. European Commission [официальный сайт]. URL: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm (дата обращения: 04.09.2013).
 27. Process validation. European Medicines Agency [официальный сайт]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002913.pdf (дата обращения: 12.02.2013).
 28. Process validation [draft guideline]. European Medicines Agency [официальный сайт]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/04/WC500125399.pdf (дата обращения: 12.02.2013).
 29. Committee for Medicinal Products for Human Use. 18-21 October 2004. Plenary Meeting / Monthly Report. European Medicines Agency [электронный ресурс]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Committee_meeting_report/2009/10/WC500006407.pdf (дата обращения: 20.08.2013).
 30. Guideline on Active Substance Master File Procedure (CHMP/QWP/227/02 Rev 3/Corr *). European Medicines Agency [электронный ресурс]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129994.pdf (дата обращения: 20.08.2013).
 31. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, S6 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [официальный сайт]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf (дата обращения: 12.08.2013).
 32. Comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process - non-clinical and clinical issues (ЕМЕА/СНМР/ВМВР/101695/2006). European Medicines Agency [официальный сайт]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003935.pdf (дата обращения: 12.02.2013).
 33. Clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins. European Medicines Agency [официальный сайт]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003029.pdf (дата обращения: 12.02.2013).
 34. Составление протокола контролируемого клинического исследования лекарственного препарата (выбор контрольной группы). Методические рекомендации. М.: НЦЭСМП 2012; 36.
 35. Peace K.E., Chen D.-G. Clinical Trial Methodology (Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series). Chapman and Hall/CRC; 1 edition, July 20, 2010; 420.
 36. Statistical analysis of results of biological assays and tests (01/2008:50300). European Pharmacopoeia, 7.8 [электронный ресурс]. Дата обращения: 11.09.2013.
 37. Пояснение для заявителей: представление и формат досье — общий технический документ. European Commission [официальный сайт]. URL: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/b/update_200805/ctd_05-2008_en.pdf (дата обращения: 11.09.2013).
 37. Государственная программа Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013-2020 годы Паспорт Государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013-2020 г. Минпромторг [официальный сайт]. URL: http://www.minpromtorg.gov.ru/repository/minprom/ministry/fcp/pharma_and_medical_industry/GP_FARMAMED.pdf (дата обращения: 06.02.2012).
 39. Новый импульс развития биотехнологий в РФ // Стволовые клетки [электронный ресурс]. URL: <http://www.stem-cells.ru/site/index.php/news/772> (дата обращения: 20.08.2013).
 40. План научно-исследовательской работы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по теме «Научное обоснование методических подходов к доклиническому и клинико-фармакологическому изучению и экспертной оценке эффективности и безопасности лекарственных средств» (№ Гос. регистрации 01201172531).

**ОТКРЫТИЕ АНТИВИРУЛЕНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО
STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

**DISCOVERY OF ANTIVIRULENCE AGENTS AGAINST
METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS /
V. KHODAVERDIAN, M. PESHO, B. TRUITT,
L. BOLLINGER, P. PATEL, S. NITHIANANTHAM, G. YU,
E. DELANEY, E. JANKOWSKY, M. SHOHAM*//
ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY
AUGUST 2013; 57: 8: 3645—3652.**

Соединения с антивирулентными свойствами подавляют образование вирулентных факторов, но не обладают бактериостатическим и бактерицидным действием. С помощью компьютерного поиска были обнаружены антивирулентные соединения в отношении метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA), штамм USA300, широко распространённого возбудителя внебольничных инфекций в США. Эти соединения влияют на реакцию регулятора AgrA, действующего как транскрипционный фактор при экспрессии некоторых важных токсинов *S. aureus*, и на вирулентные факторы, участвующие в патогенезе. Подобный виртуальный поиск сопровождался поиском и по базам данных коммерческих производителей. Обнаруженные низкомолекулярные соединения подавляли образование токсинов альфа-гемолизина и фенолорастворимого модулина в дозозависимом режиме, не подавляя бактериальный рост. Они представляют собой биарильные соединения, у которых ароматические кольца или слиты (конденсированные), или разделены коротким линкером. Одно из этих соединений утверждено FDA в качестве нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (дифлунизал) и являет собой пример нового использования старого препарата. Антивирулентные соединения могут быть полезны для профилактики и в качестве дополнительных средств при антибиотикотерапии MRSA-инфекций.

* Department of Biochemistry, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.

**ВЛИЯНИЕ СУБИНГИБИТОРНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ
АНТИБИОТИКОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ВИРУЛЕНТНЫХ
ФАКТОРОВ У ВНЕБОЛЬНИЧНОГО
МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО
STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

**EFFECTS OF SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS
OF ANTIBIOTICS ON VIRULENCE FACTOR EXPRESSION
BY COMMUNITY-ACQUIRED METHICILLIN-RESISTANT
STAPHYLOCOCCUS AUREUS / M. P. OTTO, E. MARTIN,**

**C. BADIOU, S. LEBRUN, M. BES, F. VANDENESCH,
J. ETIENNE, G. LINA, O. DUMITRESCU* // JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013;
68: 7: 1524—1532.**

Было проверено влияние субингибиторных концентраций (суб-МПК) антистафилококковых антибиотиков на экспрессию Пантон-Валентайн лейкоцидина (PVL), альфа-гемолизина (Hla) и белка A (Spa) внебольничными метициллиноустойчивыми *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Пять клинических штаммов, представляющих основные широко распространённые CA-MRSA клоны, культивировали с суб-МПК (1/8, 1/4 и 1/2 МПК) 5 антибиотиков (клиндамицин, даптомицин, линезолид, тигециклин и ванкомицин). Через 4 и 6 ч инкубации образцы культур использовали для сравнительной количественной ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к *pvl*, *hla*, *spa* и *gyrB*. Концентрации PVL, Hla и Spa измеряли в супернатанте (PVL, Hla) и в клетках (Spa), используя специфические методы ELISA. У всех проверенных штаммов клиндамицин и линезолид значительно снижали уровни мРНК для PVL и Spa. Тигециклин также снижал уровни мРНК для PVL и Spa у 3 из 5 и 4 из 5 штаммов соответственно. Даптомицин и ванкомицин не оказывали существенного влияния. Количественная оценка PVL и Spa была подтверждена зависимостью подавления образования PVL и Spa от концентрации клиндамицина и, в меньшей степени, линезолида и тигециклина. Экспрессию мРНК Hla снижал только клиндамицин, тогда как линезолид, тигециклин и даптомицин демонстрировали гетерогенные штаммо-зависимые результаты, а ванкомицин не оказывал значительного влияния. Анализ уровня Hla показал, что подавление выделения Hla в большей степени зависит от концентрации клиндамицина, чем линезолида. Итак, влияние суб-МПК на проявление вирулентности зависит как от антибиотика, так и вирулентного фактора. Клиндамицин и линезолид существенно подавляли экспрессию различных вирулентных факторов у CA-MRSA. Тигециклин специфически подавлял экспрессию PVL. Даптомицин и ванкомицин в указанных концентрациях не оказывали существенного влияния.

* Centre National de Référence des Staphylocoques, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France.

**МУТАНТЫ STAPHYLOCOCCUS AUREUS
ПО ФОРМИЛ-МЕТИОНИЛ ТРАНСФЕРАЗЕ
ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ СНИЖЕНИЕМ ОБРАЗОВАНИЯ
ВИРУЛЕНТНЫХ ФАКТОРОВ И ПАТОГЕННОСТИ.**

STAPHYLOCOCCUS AUREUS FORMYL-METHIONYL TRANSFERASE MUTANTS DEMONSTRATE REDUCED VIRULENCE FACTOR PRODUCTION AND PATHOGENICITY / T. LEWANDOWSKI, J. HUANG, F. FAN, S. ROGERS, D. GENTRY, R. HOLLAND, P. DEMARSH, K. AUBART*, M. ZALACAIN// ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JULY 2013; 57: 7: 2929—2936.

Ингибиторы пептид деформилазы (ПДФ) представляют новый класс антибактериальных соединений с новым механизмом действия. Мутации, ведущие к инаktivации формил-метионил трансферазы (ФМТ), фермента, формирующего инициаторную метионил-тРНК, приводят к альтернативной инициации белкового синтеза, не нуждающегося в деформилировании, и являются предопределяющей причиной устойчивости к ингибиторам ПДФ у *Staphylococcus aureus*. Показано, что мутации, приведшие к утрате функции ФМТ, оказывают плеiotропное влияние, заключающееся в снижении скорости роста, фенотипе негемолитического типа, резком снижении образования множественных внеклеточных белков, включая такие вирулентные факторы, как α -гемолизин, Пантон-Валентайн лейкоцидин (PVL), которые ассоциируются с патогенностью *S. aureus*. Вследствие этого, ФМТ-мутанты *S. aureus*, вызывающие модельные инфекции пиелонефрита у нейтропических и не-нейтропических мышей, сильно ослаблены, и показатель выживаемости животных значительно выше по сравнению с инфекциями, вызванными диким штаммом *S. aureus*. Исследование недавно открытого влияния на образование внеклеточных вирулентных факторов показало, что у нулевых ФМТ-мутантов более серьезные изменения фитнесса, чем предполагалось ранее, которые приводят к существенной утрате патогенности и ограниченной способности к инвазивной инфекции.

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

ВЛИЯНИЕ ЛИНЕЗОЛИДА НА ТОРМОЖЕНИЕ *IN VIVO* ОБРАЗОВАНИЯ СТАФИЛОКОККОВЫХ ТОКСИНОВ И УЛУЧШЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ НА МОДЕЛИ НЕКРОТИЗИРУЮЩЕЙ ПНЕВМОНИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* У КРОЛИКОВ.

EFFECTS OF LINEZOLID ON SUPPRESSING *IN VIVO* PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL TOXINS AND IMPROVING SURVIVAL OUTCOMES IN A RABBIT MODEL OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NECROTIZING

PNEUMONIA / B. AN DIEP*, A. AFASIZHEVA, H. N. LE, O. KAJIKAWA, G. MATUTE-BELLO, C. TKACZYK, B. SELLMAN, C. BADIOU, G. LINA, H. F. CHAMBERS// THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 2013; 208: 1: 75—82.

Линезолид рекомендован для лечения пневмонии и других инвазивных инфекций, вызванных метициллиноустойчивым *Staphylococcus aureus* (MRSA), на том основании, что линезолид подавляет *in vivo* образование сильных стафилококковых токсинов, включая Пантон-Валентайн лейкоцидин (PVL) и α -гемолизин (Hla), хотя доказательств этого недостаточно. Для определения сравнительного терапевтического действия линезолида (500 мг/кг 3 раза в сутки) и ванкомицина (30 мг/кг 2 раза в сутки), вводимых через 1,5; 4 и 9 ч после инфицирования, на выживаемость и *in vivo* образование бактериальных токсинов, использовали модель некротизирующей пневмонии, обусловленной клоном MRSA USA 300, у кроликов. Показатель смертности у нелеченных животных составил 100%, у леченных ванкомицином 83—100%, у леченных линезолидом через 1,5; 4 и 9 ч после инфицирования 25, 50 и 100% соответственно. По сравнению с нелечеными и лечеными ванкомицином животными повышенная выживаемость кроликов, получавших линезолид спустя 1,5 часа после инфицирования, была связана с уменьшением бактериальной нагрузки, подавлением образования PVL и Hla, сниженным образованием нейтрофил-хемоаттрактантного интерлейкина 8 в лёгких. Только раннее лечение линезолидом приводило к значительному подавлению синтеза токсинов и повышению показателя выживаемости на модели MRSA-некротизирующей пневмонии.

* Department of Medicine, University of California, 1001 Potrero Ave, Bldg 30, Rm 3300, San Francisco, CA 94110.

АКТИВНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ ВАРИАНТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ОБРАЗУЮЩИХ МЕЛКИЕ КОЛОНИИ: ОБЗОР ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ *IN VITRO*, НА ЖИВОТНЫХ И В КЛИНИКЕ.

ANTIBIOTIC ACTIVITY AGAINST SMALL-COLONY VARIANTS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: REVIEW OF *IN VITRO*, ANIMAL AND CLINICAL DATA / L. G. GARCIA, S. LEMAIRE, B. C. KAHL, K. BECKER, R. A. PROCTOR, O. DENIS, P. M. TULKENS, F. VAN BAMBEKE* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 7: 1455—1464.

Патогенные *Staphylococcus aureus* используют различные стратегии для персистенции в организме

хозяина, среди которых переход к фенотипу с образованием мелких колоний (SCV) имеет особое биологическое и терапевтическое значение. Фенотип SCV характеризуется слабой скоростью роста, нетипичной морфологией колоний и необычными биохимическими свойствами, что создаёт трудности при идентификации в клинической микробиологической лаборатории. Метаболические отклонения нарушают чувствительность к антибиотикам, что в сочетании со способностью выживать внутри клеток и образовывать биоплёнки некоторыми штаммами приводят к терапевтическим неудачам. В настоящем обзоре приведены литературные данные по активности антибиотиков в отношении SCV *S.aureus in vitro*, на животных и в клинике. *In vitro* SCV с дефектом транспорта электронов и тимидин-зависимостью имели высокие значения МПК для аминогликозидов и антифолатов соответственно. Значения МПК антибиотиков других классов были сравнимы с МПК родительских штаммов, но антибиотики обладали меньшей бактерицидностью. При внутриклеточной локализации ауксотрофы по тимидину, гемину или менадиону демонстрировали контрастный (противоположный) отклик на антибиотики, что зависело от различий их внутриклеточного состояния. На животных моделях SCV часто персистируют в различных местах, включая метастатические, несмотря на введение активных антибиотиков. Имеются сообщения из клиник о нескольких случаях селекции SCV после продолжительного применения не только аминогликозидов и антифолатов, но и антибиотиков некоторых других классов. Для эффективной эрадикации SCV требуются недели и даже месяцы интенсивной комбинированной политерапии, вплоть до хирургического вмешательства. Дальнейшие исследования должны привести к оптимизации лечения инфекций, вызванных SCV формами *S.aureus*.

* Pharmacologie cellulaire et moléculaire, Louvain Drug Research Institute, avenue E. Mounier 73 B1.73.05, B—1200 Bruxelles, Belgium.

ВАРИАНТЫ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ОБРАЗУЮЩИЕ МЕЛКИЕ КОЛОНИИ, НЕЗАВИСИМО АССОЦИИРУЮТСЯ С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ЛЁГОЧНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ С МУКОВИСЦИДОЗОМ.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SMALL-COLONY VARIANTS ARE INDEPENDENTLY ASSOCIATED WITH WORSE LUNG DISEASE IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS / D. J. WOLTER, J. C. EMERSON, S. MCNAMARA, A. M. BUCCAT, X. QIN, E. COCHRANE, L. S. HOUSTON, G. B. ROGERS, P. MARSH, K. PREHAR, C. E. POPE, M. BLACKLEDGE, E. DÉZIEL, K. D. BRUCE,

B. W. RAMSEY, R. L. GIBSON, J. L. BURNS, L. R. HOFFMAN* // CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2013; 57: 3: 384—391. PRESENTED IN PART: 2012 NORTH AMERICAN CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION CONFERENCE, ORLANDO, FLORIDA, OCTOBER 13, 2012.

Заболевание муковисцидозом лёгких (МВ) сопровождается хроническим инфицированием дыхательных путей разнообразными бактериями. Из респираторных выделений взрослых и детей европейского происхождения, больных МВ лёгких, с помощью специальной, но редко используемой, техники культивирования были выделены медленно растущие антибиотикоустойчивые мутанты *Staphylococcus aureus*, известные как «small-colony» варианты (SCV). SCV могут быть селекционированы либо при экспозиции с отдельными антибиотиками, либо при выращивании с другим МВ патогеном, *Pseudomonas aeruginosa*. Была сделана попытка определить распространённость, клиническую значимость и возможные механизмы селекции *S.aureus* SCV в когорте больных МВ детей в США. Было проведено 2-годичное исследование 100 детей с МВ с использованием техники культивирования, чувствительной к *S.aureus* SCV, и оценены связи с клиническими показателями с помощью мультивариантных регрессивных моделей. Инфекция *S.aureus* SCV была определена у 24% участников исследования и ассоциировалась с более сильным снижением лёгочной функции на протяжении исследования ($p=0,07$ с учётом возраста и лёгочной функции при включении в исследование). Эта связь сохранялась после корректировки на другие МВ патогены, включая *P.aeruginosa* и метициллиноустойчивый *S.aureus*. Это означает, что, возможно, имеет место *in vivo* селекция за счёт лечения триметоприм-сульфаметоксазолом или ко-инфекции с *P.aeruginosa*. Итак, инфекция *S.aureus* SCV независимо ассоциируется с плохим респираторным исходом МВ у детей. Поскольку во многих клинических микробиологических лабораториях специально не определяют *S.aureus* SCV, для подтверждения и расширения полученных результатов требуются широкомасштабные изменения в работе обычных лабораторий и клинических подходах к указанным бактериям.

* University of Washington, Department of Pediatrics, Pulmonary Division, 4800 Sand Point Way NE, Box A—5937, Seattle, WA 98105.

ОБЩИЙ РЕЗЕРВУАР ДЛЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА CCRB МЕЖДУ КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫМИ СТАФИЛОКОККАМИ И МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫМ STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

SHARED RESERVOIR OF *CCRB* GENE SEQUENCES BETWEEN COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI AND METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS / A. C. FLUIT*, N. CARPAIJ, E. A. M. MAJOOR, M. J. M. BONTEN, R. J. L. WILLEMS // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 8: 1707–1713.

Устойчивость к метициллину *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативных стафилококков (CoNS) вызвана экспрессией пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) 2a с низким аффинитетом, кодируемого геном *mecA*. Этот ген располагается на хромосомальной стафилококковой кассете *mec* (SCC*mec*) нескольких описанных типов и подтипов. CoNS и *S.aureus* имеют общие типы SCC*mec*, и можно полагать, что CoNS являются потенциальным резервуаром *mecA* для *S.aureus*. Доказательством этого является, главным образом, ПЦР-типирование SCC*mec* или методы секвенирования на ограниченном числе штаммов. В исследовании было определено генетическое родство *ccrB* последовательностей, содержащихся в SCC*mec* элементах метициллиноустойчивых штаммов CoNS и *S.aureus* из обширной и разнообразной по времени и месту сбора коллекции. Часть *ccrB* генов 367 метициллиноустойчивых CoNS и 94 *S.aureus* (MRSA) была секвенирована и сравнена. Полученные данные показали, что 92 из 94 (98%) MRSA штаммов содержали *ccrB* гены, включая различные *ccrB* аллели, которые не отличались от *ccrB* генов метициллиноустойчивых CoNS. Всего 273 из 367 (74%) CoNS имели общие с MRSA последовательности *ccrB* гена. Высокая степень идентичности *ccrB* последовательностей в географически, во времени и генотипически разнообразном наборе штаммов *S.aureus* и CoNS свидетельствует о частом горизонтальном переносе SCC*mec* между CoNS и *S.aureus*, который возможно внёс свой вклад в появление MRSA.

* Department of Medical Microbiology, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, The Netherlands.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦЕФТАРОЛИНА В ОТНОШЕНИИ СТАФИЛОКОККОВ С ПОНИЖЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ЛИНЕЗОЛИДУ, ДАПТОМИЦИНУ И ВАНКОМИЦИНУ, ВЫДЕЛЕННЫХ В БОЛЬНИЦАХ США С 2008 ПО 2011 ГГ.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CEFTAROLINE TESTED AGAINST STAPHYLOCOCCI WITH REDUCED SUSCEPTIBILITY TO LINEZOLID, DAPTOMYCIN, OR VANCOMYCIN FROM U.S. HOSPITALS, 2008 TO 2011 / H. S. SADER*, R. K. FLAMM, R. N. JONES // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JULY 2013; 57: 7: 3178–3181.

Несмотря на высокую активность ванкомицина, линезолида и даптомицина в отношении стафилококков, спорадически выделяют штаммы с пониженной чувствительностью к этим антибиотикам. С января 2008 г. по декабрь 2011 в 82 медицинских центрах США последовательно было выделено 19350 штаммов *Staphylococcus aureus* (51% устойчивых к метициллину, MRSA) и 3270 коагулазонегативных стафилококков, и референс-методом микроразведений в бульоне была протестирована их чувствительность к цефтаролину и антибиотикам сравнения. Четырнадцать (14; 0,07%) штаммов *S.aureus* характеризовались пониженной чувствительностью к линезолиду (МПК $\geq$ 8 мкг/мл), 18 (0,09%) к даптомицину (МПК $\geq$ 2 мкг/мл) и 369 (1,9%) к ванкомицину (МПК $\geq$ 2 мкг/мл; 368 штаммов с МПК 2 мкг/мл и 1 штамм с МПК 4 мкг/мл). Пятьдесят один штамм (51; 1,6%) CoNS был устойчив к линезолиду (МПК $\geq$ 8 мкг/мл), а 4 штамма (0,12%) были не чувствительны к даптомицину (МПК $\geq$ 2 мкг/мл). Цефтаролин был в целом очень активен в отношении *S.aureus* (МПК_{50/90}, 0,5/1 мкг/мл; 98,5% чувствительность), включая MRSA (MIC_{50/90}, 0,5/1 мкг/мл; 97,2% чувствительность). Все не чувствительные к даптомицину и 85,7% устойчивых к линезолиду штаммов *S.aureus* были чувствительны к цефтаролину. Чувствительность к цефтаролину, даптомицину и линезолиду штаммов *S.aureus* с МПК ванкомицина $\geq$ 2 мкг/мл соответственно составляла 91,9; 96,2 и 98,9%. Штаммы CoNS были чувствительны к цефтаролину (МПК_{50/90}, 0,25/0,5 мкг/мл; 99,1% штаммов подавлялись при концентрации $\leq$ 1 мкг/мл), в т. ч. штаммы, устойчивые к метициллину (МПК_{50/90}, 0,25/0,5 мкг/мл), линезолиду (МПК_{50/90}, 0,25/0,5 мкг/мл), и не чувствительные к даптомицину (4 штамма; МПК в пределах 0,03–0,12 мкг/мл). Таким образом, цефтаролин продемонстрировал высокую *in vitro* активность в отношении стафилококков с пониженной чувствительностью к линезолиду, даптомицину и ванкомицину и может рассматриваться как антибиотик выбора при лечении инфекций, обусловленных стафилококками со множественной устойчивостью.

* JMI Laboratories, North Liberty, Iowa, USA.

НАЛИЧИЕ И ДИССЕМИНАЦИЯ ГЕНА МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОСТИ *CFR* У ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ. ОБЗОР.

PRESENCE AND DISSEMINATION OF THE MULTIRESTANCE GENE *CFR* IN GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE

Появление гена мультирезистентности *cfr* у стафилококков является предметом всеобщего внимания. В дополнение к устойчивости к фениколам, линкозамидам, стрептограмину А и отдельным 16-членным макролидам ген *cfr* также обеспечивает устойчивость к оксазолидинону линезолиду, являющемуся антибиотиком «последней линией обороны» при лечении тяжёлых инфекций, вызванных устойчивыми грамположительными бактериями. Ген *cfr* часто локализуется на плазмидах, некоторые из которых описаны, отличающихся структурой, размерами и наличием дополнительных генов устойчивости. Такие плазмиды являются важным резервуаром для распространения гена *cfr* не только внутри одного вида бактерий, но и других видов и родов. Более того, ген *cfr* обнаруживается в тесной близости с различными инсерционными последовательностями, которые, возможно, также играют важную роль в его диссеминации. В обзоре суммируются последние данные о генетическом окружении гена мультирезистентности *cfr* с акцентом на мобильные генетические элементы и сопутствующие гены резистентности, которые могут способствовать его распространению.

* Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Höltystrasse 10, 31535 Neustadt-Mariensee, Germany.

АКТИВНОСТЬ BAL30072 И ЕГО КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРАМИ БЕТА-ЛАКТАМАЗ ИЛИ МЕРОПЕНЕМОМ В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ К КАРБАПЕНЕМАМ ENTEROBACTERIACEAE И НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ.

ACTIVITY OF BAL30072 ALONE OR COMBINED WITH β -LACTAMASE INHIBITORS OR WITH MEROPENEM AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE AND NON-FERMENTERS / S. MUSHTAQ, N. WOODFORD, R. HOPE, R. ADKIN, D. M. LIVERMORE* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 7: 1601—1608.

Исследовали активность BAL30072, диоксипиридон моносульфактама, как одного, так и в комбинации с BAL29880 (для подавления AmpC), и/или клавуланатом (подавляет бета-лактамазы расширенного спектра, ESBL), и меропенемом (1:1) в отношении устойчивых к карбапенемам Enterobacteriaceae и неферментирующих бактерий. Культуры микроорганизмов были получены

из многих больниц Великобритании. МПК определяли разведениями в агаре по методике CLSI. Карбапенемазы идентифицировали ПЦР и секвенированием. BAL30072 подавлял 69% карбапенемоустойчивых Enterobacteriaceae при ≤ 4 мг/л, включая 60—87% штаммов, продуцирующих OXA-48, IMP, NDM и VIM ферменты или сочетающих непроницаемость мембраны с образованием AmpC или ESBL, а также 40% штаммов, продуцирующих KPC ферменты. Для комбинации BAL30072+BAL29880+клавуланат показатель чувствительности превышал 90%, за исключением штаммов с KPC карбапенемазами, относящихся к международному секвенс-типу (ST) 258 *Klebsiella pneumoniae* клона и сохраняющих устойчивость. При концентрации 4 мг/л BAL30072 был активен в отношении всех OprD-дефицитных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, 8/12 штаммов с устойчивостью к беталактамам по типу помпового выброса и 19/25 продуцентов металло-бета-карбапенемаз. Этот показатель незначительно увеличивался при добавлении ингибиторов. Большинство культур *Acinetobacter baumannii*, образующих OXA или NDM карбапенемазы, было чувствительно к BAL30072 в концентрации ≤ 4 мг/л, кроме продуцентов OXA-58, остающихся устойчивыми, возможно, не из-за присутствия бета-лактамазы. Добавление меропенема к BAL30072 повышало активность в отношении некоторых штаммов, что не было отчётливо связано с механизмом устойчивости, кроме OprD-дефицитных штаммов *P. aeruginosa*, в отношении которых имело место существенное усиление активности. Итак, BAL30072 обладал хорошей активностью в отношении бактерий с различными типами устойчивости к карбапенемам. Добавление клавуланата и/или BAL29880 расширяло спектр активности в отношении устойчивых к карбапенемам Enterobacteriaceae, но не неферментирующих бактерий. Добавление меропенема приводило к небольшому увеличению активности в отношении отдельных штаммов. Общераспространённой оставалась устойчивость представителей *K. pneumoniae* ST258 KPC клона, даже при добавлении обоих ингибиторов или меропенема.

* Norwich Medical School, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK.

ХРОМОСОМНАЯ OXA-48 КАРБАПЕНЕМАЗА ВЫСОКОВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА ESCHERICHIA COLI.

CHROMOSOME-MEDIATED OXA-48 CARBAPENEMASE IN HIGHLY VIRULENT ESCHERICHIA COLI / R. BEYROUTHY, F. ROBIN, A. COUGNOUX, G. DALMASSO, A. DARFEUILLE-MICHAUD, H. MALLAT, F. DABBOUSSI, M. HAMZÉ,

R. BONNET* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 7: 1558—1561.

Распространено мнение, что бактерии со множественной устойчивостью к антибиотикам слабо-вирулентны. Однако характер вирулентности устойчивых к карбапенемам Enterobacteriaceae не изучен. Проведено исследование вирулентности и механизма устойчивости внекишечного патогенного штамма (LEB15) *Escherichia coli* (ExPEC) с пониженной чувствительностью к карбапенемам. МПК определяли методом микроразведений. Гены, кодирующие бета-лактамазу идентифицировали ПЦР и секвенированием, генетическое окружение анализировали PFGE (гель-электрофорез в пульсирующем поле) и ПЦР-картированием. Генетический фон исследовали мультилокусным секвенс-типированием (MLST). Гены, кодирующие вирулентные факторы и «островки патогенности» (PAIs), определяли мультиплексной ПЦР. Вирулентность оценивали на модели сепсиса у мышей. Штамм LEB15 продуцировал хромосомальную OXA-48 карбапенемазу. Сложный *bla*_{OXA-48}-кодирующий транспозон Tn1999.2 был встроен в LEB15 хромосому. Штамм относился к MLST кластеру появившихся ExPEC штаммов (ST-127/ST-22). Он обладал высоким показателем патогенности и восемью PAI (I₅₃₆, II₅₃₆, III₅₃₆, IV₅₃₆, VI₅₃₆, I_{CFT073}, II_{CFT073} и II₉₆), вызывал необычно высокую летальность на модели сепсиса у мышей. Итак, штамм LEB15 сочетал атипично широкий набор вирулентных факторов, обеспечивающих ему фенотип «убийцы», и пониженную чувствительность к карбапенемам, благодаря наличию в хромосоме бета-лактамазного гена *bla*_{OXA-48}. Подобная ассоциация вирулентности и карбапенемазы в штаммах *E. coli* может создать большие проблемы в будущем при лечении *E. coli* инфекций.

* CHU, Laboratoire de Bacteriologie, 58 rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France.

ВЫЯВЛЕНИЕ В ГЕРМАНИИ NDM-7, НОВОГО ВАРИАНТА НЬЮ-ДЕЛИЙСКОЙ МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ С ПОВЫШЕННОЙ КАРБАПЕНЕМАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.

DETECTION OF NDM-7 IN GERMANY, A NEW VARIANT OF THE NEW DELHI METALLO- β -LACTAMASE WITH INCREASED CARBAPENEMASE ACTIVITY / S. GÖTTIG*, A. G. HAMPRECHT, S. CHRIST, V. A. J. KEMPF, T. A. WICHELHAUS // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 8: 1737—1740.

В настоящем исследовании охарактеризован новый вариант нью-дельийской металло-бета-лак-

тазы (NDM). Мультирезистентный штамм *Escherichia coli* был выделен из раны, глотки и прямой кишки больного йеменца, помещённого во франкфуртский университетский госпиталь, Германия. Наличие бета-лактамазы было установлено ПЦР и секвенированием. Штамм был исследован методами тестирования чувствительности, конъюгации и трансформации и плазмидного анализа. Штамм *E. coli* был устойчив ко всем бета-лактамам, включая карбапенемы. ПЦР-анализ выявил бета-лактамазные гены *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} и *bla*_{NDM}. Секвенирование показало, что ген *bla*_{NDM} отличается от *bla*_{NDM-1} двумя точечными мутациями в положениях 388 (G→A) и 460 (A→C), что соответствовало замещениям аминокислот Asp130Asn и Met154Leu. Данный вариант NDM был идентифицирован как NDM-7. Ген *bla*_{NDM-7} был локализован на самостоятельной (отдельной) трансферабельной плазмиде IncX3 размером 60 тпн. Трансформанты *E. coli* TOP10, несущие NDM-7, характеризовались более высокими значениями МПК беталактамов, в т.ч. карбапенемов, чем трансформанты, содержащие NDM-1. Мультилокусным секвенс-типированием установлено, что штамм *E. coli* принадлежит к новому секвенс-типу (ST599). В результате исследования идентифицирован новый вариант NDM у *E. coli*, NDM-7, характеризующийся высокой способностью гидролизовать беталактаменные антибиотики. Разнообразные NDM варианты, локализованные на независимой трансферабельной плазмиде и обнаруженные у разных видов грамотрицательных бактерий в различных странах, свидетельствуют о возможности эффективной глобальной диссеминации гена *bla*_{NDM}.

* Institute for Medical Microbiology and Infection Control, Hospital of Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany.

АКТИВНОСТЬ БИАПЕНЕМА (RPX2003) В КОМБИНАЦИИ С БОРСОДЕРЖАЩИМ ИНГИБИТОРОМ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ RPX7009 В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ К КАРБАПЕНЕМАМ ENTEROBACTERIACEAE.

ACTIVITY OF BIAPENEM (RPX2003) COMBINED WITH THE BORONATE β -LACTAMASE INHIBITOR RPX7009 AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE / D. M. LIVERMORE*, S. MUSHTAQ // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 8: 1825—1831.

Появление карбапенемаз у Enterobacteriaceae требует новых подходов в терапии. В настоящее время интерес представляют комбинации с ингибиторами бета-лактамаз. RPX7009 — новый борсодержа-

ший ингибитор некоторых бета-лактамаз классов А и С. Разработана его комбинация с биапенемом (RPX2003) и исследована её *in vitro* активность. Было протестировано 300 штаммов Enterobacteriaceae, продуцирующих основные типы карбапенемаз, и определена МПК методом разведений в агаре с RPX7009 (2, 4 и 8 мг/л) или в формате «шахматной доски» с двукратными разведениями RPX7009 от 0.25 до 32 мг/л. RPX7009 не обладал непосредственной антибактериальной активностью, но усиливал активность биапенема в дозозависимом режиме в отношении Enterobacteriaceae, продуцирующих КРС, SME или IMI/NMC-A карбапенемазы: при концентрациях менее 2 мг/л снижал МПК биапенема до ≤ 1 мг/л у более чем 90% штаммов. RPX7009 слабо усиливал активность биапенема в отношении штаммов Enterobacteriaceae, обладающих дополнительно активностью бета-лактамаз AmpC типа или расширенного спектра, а также пониженной проницаемостью мембран, хотя частичное увеличение активности в отношении таких штаммов будет зависеть от значения пограничных концентраций. RPX7009 не влиял на МПК биапенема у штаммов, образующих металло- (IMP, NDM или VIM) или OXA-48 бета-лактамазы; но большинство штаммов с такими ферментами менее устойчивы к биапенему, чем к имипенему или, особенно, эртапенему. Комбинация биапенем/RPX7009 (Carbavance) преодолевает в большинстве случаев устойчивость, обусловленную КРС и другими карбапенемазами класса А. Карбапенемазы класса В и D не подавлялись ею, но эти ферменты обеспечивали меньшую устойчивость к биапенему, чем к другим карбапенемам.

* Norwich Medical School, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОРИПЕНЕМА И ЭРТАПЕНЕМА В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ И НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ КРС-2 И ИМЕЮЩИХ СХОДНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ МПК.

EFFICACY OF DORIPENEM AND ERTAPENEM AGAINST KPC-2-PRODUCING AND NON-KPC-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* WITH SIMILAR MICS / M. HAGIHARA, J. L. CRANDON, C. URBAN, D. P. NICOLAU* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 7: 1616—1618.

В условиях клиники при выборе антибиотикотерапии обычно руководствуются профилем антибиотикочувствительности у возбудителя инфекции. Оценивали активность дорипенема и эртапенема в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae*, имею-

щих сходные значения МПК, но разные генотипы: продуцирующий и не продуцирующий карбокси-пенемазу КРС. На модели инфекции бедра у мышей были протестированы 5 не чувствительных к дорипенему, 3 образующих КРС карбапенемазы и 2 с модификацией поринов плюс образующих AmpC бета-лактамазу штаммов *K. pneumoniae*. МПК эртапенема у всех штаммов была >32 мг/л. Режимы введения дорипенема [2 г каждые 8 час. (4-часовая инфузия)] и эртапенема [1 г каждые 24 ч (0,5 часовая инфузия)] имитировали профиль «время-концентрация» у человека; начало введения антибиотиков — через 2 часа после инокуляции. Изменения бактериальной нагрузки оценивали после 24-часовой терапии. В согласии со значением МПК лечение эртапенемом имело минимальный эффект в случае всех штаммов. При сравнении активности дорипенема в отношении продуцирующих и не продуцирующих КРС штаммов, имеющих значение МПК 8 мг/л, более высокая активность наблюдалась у не-продуцентов КРС ($p < 0,001$). Такие же результаты были получены при сравнении 2 штаммов-продуцентов КРС с МПК 24 мг/л и >32 мг/л и не-продуцентов КРС с МПК 32 мг/л: активность в отношении последних была значительно выше ($p < 0,001$). Итак, при сходных значениях МПК дорипенема его активность выше в отношении штаммов, не образующих КРС по сравнению с продуцентами КРС. Поскольку *in vitro* МПК обычно является единственным критерием при выборе антибиотика, последующий за определением МПК генетический анализ может сыграть свою роль в прогнозировании *in vivo* активности.

* Center for Anti-Infective Research and Development, Hartford Hospital, Hartford, CT, USA.

СВЯЗЬ НОВОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДАМ RMTF С NDM КАРБАПЕНЕМАЗОЙ У ENTEROBACTERIACEAE, ВЫДЕЛЕННЫХ В ИНДИИ И ВЕЛИКОБРИТАНИИ.

ASSOCIATION OF THE NOVEL AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE DETERMINANT RMTF WITH NDM CARBAPENEMASE IN ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED IN INDIA AND THE UK / L. HIDALGO, K. L. HOPKINS, B. GUTIERREZ, C. M. OVEJERO, S. SHUKLA, S. DOUTHWAITE, K. N. PRASAD, N. WOODFORD, B. GONZALEZ-ZORN* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 7: 1543—1550.

16S рРНК метилтрансферазы (Rmt) являются тем механизмом, который обеспечивает высокий уровень устойчивости к клинически значимым аминогликозидам и связан с другим важным ме-

ханизмом устойчивости, таким как NDM-1. Задачей исследования было выявить гены, кодирующие указанные ферменты в штаммах с высоким уровнем устойчивости (МПК > 200 мг/л) к гентамицину и амикацину, выделенных в индийских больницах, и провести поиск нового фермента RmtF в 132 английских штаммах, содержащих NDM-1. Все высокоустойчивые к аминогликозидам штаммы были обследованы на присутствие *armA* и *rmtA-E* с помощью ПЦР, а опыты по клонированию были выполнены со штаммами, не содержащими эти гены. Определение субстрата (мишени) метилирования новой RmtF метилтрансферазы было выполнено методом ионизационной время-пролётной (MALDI) масс-спектрометрии. Далее штаммы, содержащие RmtF, были охарактеризованы по чувствительности, PFGE, электропорации, ПЦР-типированию репликона и мультилокусному секвенс-типированию плазмид, несущих *rmtF*. Высокий уровень устойчивости к аминогликозидам был выявлен у 140/1000 (14%) последовательных индийских штаммов Enterobacteriaceae. ArmA, RmtB и RmtC были идентифицированы у 46%, 20% и 27% этих штаммов соответственно. Новый ген *rmtF* был определён у 34 аминогликозидоустойчивых штаммов (общая распространённость 3,4%), большинство штаммов (59%) также содержало ген *bla_{NDM}*; *rmtF* был обнаружен у 6 продуцентов NDM, выделенных в Великобритании. Он был локализован на различных плазмидах. Четыре (4) и 2 штамма соответственно были устойчивы к тигециклину и колистину. Таким образом, у представителей Enterobacteriaceae часто обнаруживали ассоциацию RmtF с NDM на различных плазмидах. Это представляет клинический интерес, поскольку, как было показано, RmtF-и NDM-положительные штаммы были дополнительно устойчивы к тигециклину и колистину, антибиотикам последнего резерва при лечении тяжёлых бактериальных инфекций.

* Department of Animal Health and VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

СООТНОШЕНИЕ СТРУКТУРА–ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ У ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АМФОТЕРИЦИНА В.

STRUCTURE-ANTIFUNGAL ACTIVITY RELATIONSHIPS OF POLYENE ANTIBIOTICS OF THE AMPHOTERICIN B GROUP / A. N. TEVYASHOVA, E. N. OLSUFYEVA, S. E. SOLOVIEVA, S. S. PRINTSEVSKAYA, M. I. REZNIKOVA, A. S. TRENIN, O. A. GALATENKO, I. D. TRESHALIN, E. R. PEREVERZEVA, E. P. MIRCHINK, E. B. ISAKOVA, S. B. ZOTCHEV, M. N. PREOBRAZHENSKAYA* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2013: 57: 8: 3815–3822.

Выполнен всеобъемлющий сравнительный анализ соотношения структура–противогрибковая активность серии биосинтетических аналогов нистатина и их новых полусинтетических производных, а также амфотерицина В (АМВ) и его полусинтетических производных. Результаты анализа показали существенное влияние структуры полиоловой области C-7 — C-10 на активность полиеновых антибиотиков. Согласно сравнительному анализу положения гидроксильных групп в молекуле антибиотика и *in vitro* противогрибковой активности, наиболее активными были соединения, содержащие гидроксильные группы в C-8 и C-9 или C-7 и C-10 положениях. Антибиотики с ОН группами в положениях C-7 и C-9 обладали наименьшей активностью. Замещение карбоксила C-16 метильной группой незначительно влияло на *in vitro* противогрибковую активность антибиотиков с немодифицированной аминогруппой микозамина. И, наоборот, активность N-модифицированных производных модулировалась при наличии CH₃ или COOH группы в положении C-16. У самых активных соединений были определены величина максимальной переносимой дозы и противогрибковая активность на модели кандидозного сепсиса у лейкопенических мышей (индукция циклофосфамидом). Исследование полученной библиотеки полусинтетических полиеновых антибиотиков привело к открытию соединений, а именно, N-(1-лизил)-BSG005 (соединение 3n) и, особенно, 1-глутамат 2-(N,N-диметиламино) этил амид S44HP (соединение 2j), с высокой противогрибковой активностью, сравнимой в *in vitro* и *in vivo* тестах с АМВ, но с улучшенными токсикологическими свойствами.

* Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia.

РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА, ОКАЗЫВАЕМОГО АЗОЛАМИ И АМФОТЕРИЦИНОМ В НА ПАТОГЕННЫЙ ГРИБОК CRYPTOCOCCUS GATTII.

THE ROLE OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE BURSTS CAUSED BY AZOLES AND AMPHOTERICIN B AGAINST THE FUNGAL PATHOGEN CRYPTOCOCCUS GATTII / G. FREITAS FERREIRA, L. DE MATOS BALTAZAR, J. RIBEIRO ALVES SANTOS, A. SOUZA MONTEIRO, L. ALVES DE OLIVEIRA FRAGA, M. APARECIDA RESENDE-STOIANOFF, D. ASSIS SANTOS* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 8: 1801–1811.

При том, что самыми общепризнанными механизмами действия амфотерицина В (АМВ) и азолов считается их действие на синтез эргостерола, возможны и другие типы влияния этих соедине-

ний на клетки гриба. Исследовали роль эндогенных форм активного кислорода (РОС) и перекиси нитрита, образуемых азолами и АМВ, у *Cryptococcus gattii*. Для оценки влияния оксидативного и нитрозативного стрессов, индуцированных указанными антимикотиками на *C.gattii*, исследовали такие параметры, как образование перекисей липидов, содержание эргостерола, образование РОС и перекиси нитрита, ферментативная активность антиоксидантной системы, *in vitro* взаимодействие антимикотиков с ингибиторами пероксидазы и пероксид-дисмутазы и утилизатором пероксинитрита. Как показали результаты, итраконазол вызывает образование РОС и перекисей липидов в клетках *C.gattii* на ранних стадиях обработки, что не наблюдалось с флуконазолом. Это явление сильно увеличивает активность ферментов антиоксидантной системы, что было подтверждено явлением синергизма между ингибито-

ром каталазы и итраконазолом. АМВ приводил к пероксидации липидов благодаря усиленному образованию оксидативных и нитрозативных радикалов активизированной пероксидазой. Полученные данные были подтверждены также синергидным взаимодействием между ингибиторами каталазы/супероксид-дисмутазы и АМВ. Кроме того, влиянию этого антимикотика противодействовал «ловец» пероксинитрита. Таким образом, оксидативный и нитрозативный стрессы играют важную роль в противогрибковой активности итраконазола и АМВ в отношении *C.gattii*.

* Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil.

Подготовлено Н. С. Бондаревой



Узнать о решениях компании по оснащению современной бактериологической лаборатории.



Время на выбор
антибактериальной терапии...

Время на ожидание
ответа из лаборатории...

Время на анализ ситуации с
микробной резистентностью...

**ПОЛНОСТЬЮ
АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ
ЛАБОРАТОРИЯ**
эффективность
без потери времени !

**Комплексное решение для определения и контроля
антибиотикорезистентности.**



VITEK MS и VITEK 2:

Идентификация микроорганизмов
за несколько минут методом масс-спектрометрии;
Определение чувствительности к антимикробным препаратам;
Интерпретация результатов.



Etest- количественная оценка чувствительности (МИК):

Широкий спектр микроорганизмов;
Выявление механизмов резистентности;
Подбор режима дозирования антибиотиков.



MYLA – информационная система:

Эпидемиологический и статистический анализ;
Мониторинг антибиотикорезистентности.

 **BE S.M.A.R.T. WITH RESISTANCE™**
Solutions to Manage the Antimicrobial Resistance Threat

