

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 62



7-8'2017

Научно-практический журнал

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»
Issued 12 times a year
Since 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2017

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 2017

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 62

7—8'2017

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.
Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.
Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Проф., д. м. н. Белобородов В. А.
Проф. Говорун В. М.
Проф. Гомберг М. А.
Д. б. н. Даниленко В. Н.
Проф. Климко Н. Н.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Хрянин 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

- Смолина Т. П., Запорожец Т. С., Беседнова Н. Н.
Активация клеток врождённого иммунитета человека
липолисахаридом и экстрацеллюлярным
полисахаридом морских бактерий
- Альмяшева Н. Р., Ярина М. С., Голышкин А. В.,
Джавахян Б. Р., Краснополянская Л. М.
Антиоксидантные свойства водорастворимых
полисахаридов и этанольных экстрактов мицелия
ксилотрофных базидиальных грибов
- Портной Ю. А., Довженко С. А., Кобрин М. Б.,
Трещалин М. И., Голобродо В. А.,
Тевяшова А. Н., Фирсов А. А.
Фармакокинетика оливамида при внутривенном введении
крысам и кроликам (пилотное исследование)

В помощь практикующему врачу

- Сидоренко С. В., Колбин А. С., Шляпников С. А.,
Кужель А. М., Репина А. В., Лобзин Ю. В., Клишко Н. Н.,
Яблонский П. К., Мазуров В. А., Щеголев А. В.,
Рудакова А. В., Данильченко А. Р., Мухина Н. В.,
Маликов А. Я., Балькина Ю. Е., Мосикян А. А.
Фармакоэпидемиологическое исследование
использования антибактериальных средств
в многопрофильных стационарах Санкт-Петербурга
- Васильева Е. И., Соколова В. И., Сычев Д. А., Бабарина М. Б.
Видовой состав уропатогенов и диапазон чувствительности
к антибиотикам основных возбудителей,
выделенных из мочи больных с мочекаменной болезнью
- Жаркова Л. П., Смолянкин Н. Н., Грекова А. И., Козлов С. Н.
Микробиологическое обоснование выбора
антимикробных препаратов
для терапии сальмонеллёза у детей

Стандартизация и контроль лекарственных средств

- Воропаев А. А., Фадейкина О. В.,
Ермолаева Т. Н., Давыдов Д. С., Кудашева Э. Ю.
Оценка возможности применения метода Култера
(электрочувствительных зон) для определения невидимых
механических включений в лекарственных препаратах
крови человека отечественного производства
- Шаповалова О. В., Шадрин П. В.,
Неугодова Н. П., Гунар О. В., Долгова Г. В.
Валидационные процедуры для определения показателя
«Бактериальные эндотоксины»
- Прокопьев А. С., Ивлев В. А., Васильев В. Г.,
Горяинов С. В., Абрамович Р. А., Калабин Г. А.
Новая методология быстрого мониторинга аутентичности
и определения содержания фармацевтических субстанций
в антибиотиках без использования стандартных образцов

Обзоры

- Виноградова К. А., Филиппова С. Н., Полин А. Н.
Морфогенез, программируемая клеточная смерть
и антибиотикобразование у стрептомицетов
в условиях погруженного роста.
- Зырянов С. К., Сычев И. Н., Гущина Ю. Ш.
Современные проблемы инфекций,
вызванных MRSA, и пути их решения
- Дворецкий Л. И., Суворова М. П., Яковлев С. В.
Ятрогенные события при антибактериальной терапии
(поражение лёгких)

Original Papers

- 3 Smolina T. P., Zaporozhets T. S., Besednova N. N.
Activation of Innate Immunity Human Cells
by Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide
Produced by Marine Bacteria
- 8 Almyasheva N. R., Yarina M. S., Golyshkin A. V.,
Dzhavakhyan B. R., Krasnopol'skaya L. M.
Antioxidant Properties of Water-Soluble
Polysaccharides and Ethanol Extracts
of Xylotrophic Basidiomycetes Mycelium
- 13 Portnoy Yu. A., Dovzhenko S. A., Kobrin M. B.,
Treshalin M. I., Golobrodo V. A.,
Tevyashova A. N., Firsov A. A.
Pharmacokinetics of Olivamide
after Bolus Administration in Rats and Rabbits (a Pilot Study)

Guidelines for Practitioners

- 17 Sidorenko S. V., Kolbin A. S., Shlyapnikov S. A., Kuzhel A. M.,
Repina A. V., Lobzin Yu. V., Klimko N. N., Yablonsky P. K.,
Mazurov V. A., Shchegolev A. V., Rudakova A. V.,
Danilchenko A. R., Mukhina N. V., Malikov A. Ya.,
Balykina Yu. E., Mosikyan A. A.
Pharmacoepidemiological Study
of the Use of Antibacterial Agents
in the Multi-Speciality Hospitals of St. Petersburg
- 24 Vasilyeva E. I., Sokolova V. I., Sychev D. A., Babarina M. B.
Species Composition of Uropathogens and Sensitivity Range
to Antibiotics of the Main Pathogens Isolated
from the Urine of Patients with Urolithiasis
- 30 Zharkova L. P., Smolyankin N. N., Grekova A. I., Kozlov S. N.
Microbiological Justification
of the Germicide Selection for the Treatment
of Salmonellosis in Children

Drug Standardization and Control

- 36 Voropaev A. A., Fadeikina O. V., Ermolaeva T. N., Davydov D. S.,
Kudasheva E. Yu.
The Assessment of the Possibility to Use the Coulter's Method
(Electrosensitive Zones) for Identification of Invisible
Particulate Matter in Human Blood-Derived Products
Produced in Russia
- 42 Shapovalova O. V., Shadrin P. V.,
Neugodova N. P., Gunar O. V., Dolgova G. V.
Validation Procedures for the Determination of the Indicator
«Bacterial Endotoxins»
- 48 Prokop'ev A. S., Ivlev V. A., Vasil'ev V. G., Goryainov S. V.,
Abramovich R. A., Kalabin G. A.
New Methodology for Rapid Monitoring of the Authenticity
and for Determination of the Pharmaceutical Ingredients
of Antibiotics Without the Use of Reference Materials

Reviews

- 56 Vinogradova K. A., Filipova S. N., Polin A. N.
Morphogenesis, Programmed Cell Death
and Antibiotic Formation in Streptomycetes
Under Conditions of Submerged Growth
- 69 Zyryanov S. K., Sychev I. N., Gushchina Yu. Sh.
Current Problems of Infections Caused
by MRSA and Ways to Address Them
- 80 Dvoretzky L. I., Suvorova M. P., Yakovlev S. V.
Iatrogenic Events During Antibiotic Therapy
(Pulmonary Disease)

* 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.

Активация клеток врождённого иммунитета человека липополисахаридом и экстрацеллюлярным полисахаридом морских бактерий

Т. П. СМОЛИНА*, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ, Н. Н. БЕСЕДНОВА

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Activation of Innate Immunity Human Cells by Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide Produced By Marine Bacteria

T. P. SMOLINA, T. S. ZAPOROZHETS, N. N. BESEDNOVA

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

С помощью цитометрического метода показано, что липополисахарид (ЛПС) и экстрацеллюлярный полисахарид (ЭПС), выделенные из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, увеличивают относительное количество моноцитов, синтезирующих IL-12. ЛПС и ЭПС повышают цитотоксический потенциал NK-клеток, усиливая их дегрануляцию (экспрессию мембранного CD107a), внутриклеточный синтез IFN- γ и увеличивая экспрессию молекул CD25, CD69, HLA-DR, CD11b и CD54.

Ключевые слова: морские бактерии, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, врождённый иммунитет, липополисахарид, экстрацеллюлярный полисахарид, NK-клетки, CD107a, внутриклеточные цитокины.

It has been shown that using the cytometric method lipopolysaccharide (LPS) and extracellular polysaccharide (EPS) isolated from marine bacteria *Pseudoalteromonas nigrifaciens* increase the relative amount of monocytes synthesizing IL-12. LPS and EPS enhance the cytotoxic potential of NK cells, enhancing their degranulation (expression of membrane CD107a), intracellular synthesis of IFN- γ and increasing the expression of CD25, CD69, HLA-DR, CD11b, and CD54 molecules.

Keywords: marine bacteria, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, innate immunity, lipopolysaccharide, extracellular polysaccharide, NK cells, CD107a, intracellular cytokines.

Способность NK-клеток (натуральных киллеров) быстро осуществлять эффекторные функции, направленные на элиминацию заражённых и повреждённых клеток организма, позволяет отнести их к клеткам системы врождённого иммунитета. Стимуляция NK-клеток различными растворимыми веществами и/или контактными взаимодействиями приводит к изменению их фенотипа, функциональных свойств и возможности более эффективно осуществлять контактный цитолиз [1].

Для поиска препаратов, активирующих клетки врождённого иммунитета, перспективно применение гликополимеров микробного происхождения, несущих патоген-ассоциированные молекулярные структуры, распознающиеся системой врождённого иммунитета. Известно, что липополисахариды (ЛПС) клеточных стенок грамотрицательных бактерий могут активировать NK-клетки [2], однако входящий в их состав токсический

компонент (липид А) является препятствием для создания фармакологических препаратов.

В последнее время наблюдается повышенный научный интерес к морской микробиологии. Многие соединения, изолированные из морских гетеротрофных бактерий, являются уникальными по своей структуре и/или физиологическому действию [3]. Как оказалось, гликополимеры морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* содержат необычные структурные варианты липида А с низким эндотоксическим потенциалом. Эти бактерии могут культивироваться в искусственных условиях и перспективны для биотехнологии [4, 5]. Ранее нами было показано, что ЛПС и экстрацеллюлярный полисахарид (ЭПС), выделенные из морских бактерий *P. nigrifaciens*, активируют нейтрофилы и моноциты, а также усиливают миграционный потенциал этих клеток [6].

В связи с этим теоретический и практический интерес представляют возможности ЛПС и ЭПС *P. nigrifaciens* оказывать влияние на эффекторные функции NK-клеток человека и способность моноцитов синтезировать IL-12, который, действуя

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: E-mail tsmol@mail.ru

на NK-клетки, активирует их и способствует выработке IFN- γ .

Цель работы — изучение влияния ЛПС и ЭПС *P. nigrifaciens* на внутриклеточную продукцию IL-12 моноцитами и на изменение функциональной активности и фенотипа NK-клеток. Для этого исследовали изменение экспрессии активационных маркеров (CD25 и CD69), молекул адгезии (CD11b и CD54) и главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR), маркера дегрануляции CD107a на мембранах NK-клеток, а также — внутриклеточную продукцию γ -ИФН NK-клетками.

Материал и методы

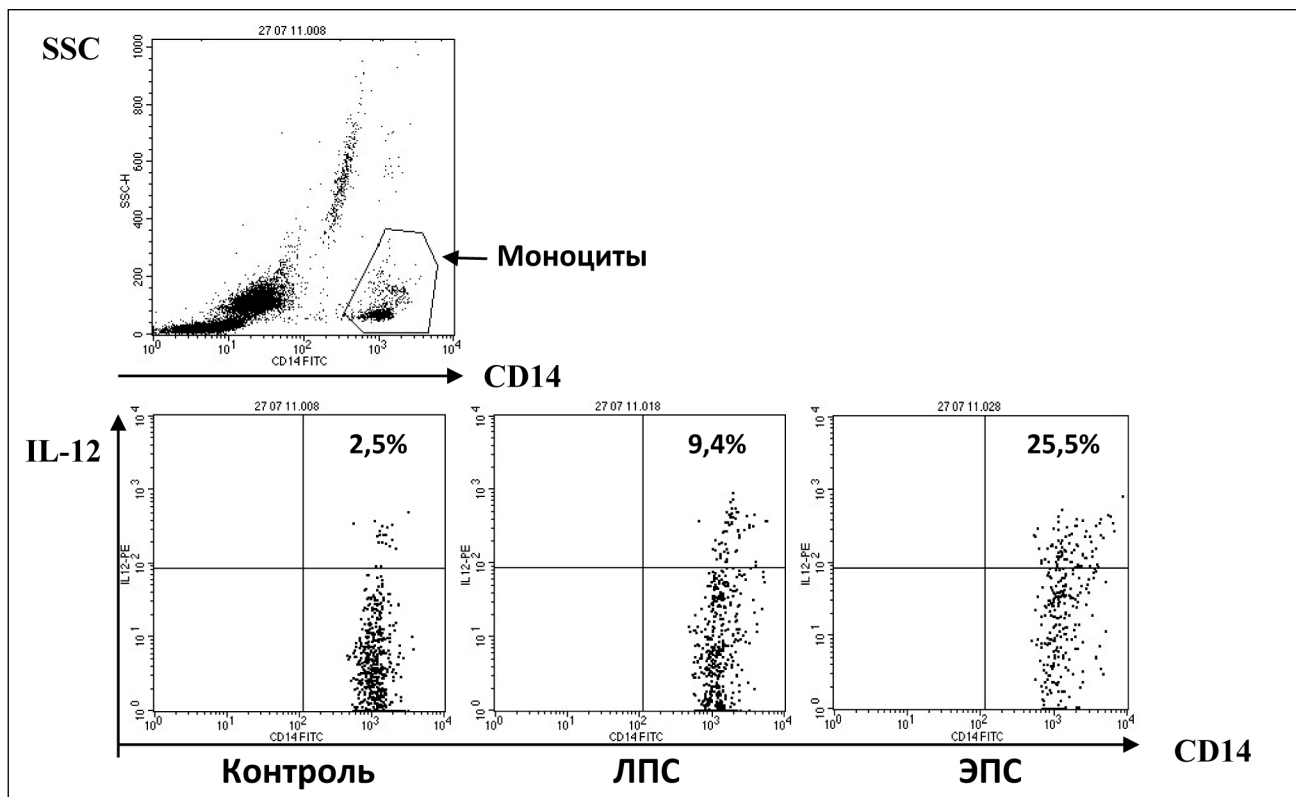
ЛПС и ЭПС получены из штамма КММ 156 бактерий *P. nigrifaciens*, выделенных из ткани желудка дальневосточного двусторчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*. ЭПС состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-рамнозы, один остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы и один остаток 3-O-[(R)-1-карбоксиэтил]-D-глюкозы (гликолактиловой кислоты) [7]. Гликополимеры выделены и любезно предоставлены для исследования сотрудниками Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова.

Материалом для исследования служила полученная от здоровых доноров периферическая кровь с гепарином (25 ЕД/мл), которую разводили в соотношении 1:2 полной питательной средой (среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,01 M HEPES, 200 мМ L-глутамин, 100 мг/мл гентамицина). Использование цельной крови не требует выделения и подготовки клеток к культивированию, устраняет неспецифическую активацию клеток на этапах сепарации, и при этом сохраняется существующий *in vivo* баланс различных типов клеток крови.

Исследуемые гликополимеры растворяли в 0,9% растворе NaCl и вносили образцы в кровь в конечных концентрациях 10 и 100 мкг/мл. В контрольные пробы вносили 0,9% раствор NaCl в объеме, равном таковому раствору гликополимеров.

Уровень экспрессии поверхностных молекул определяли методом цитометрического анализа в программе «CellQuest Pro» на проточном цитометре «FACSCalibur» («Becton Dickinson») с использованием моноклональных антител к молекулам CD3-FITC, CD14-PE, CD69-PE, CD11b-PE, CD25-PE, CD54-PE, HLA-DR-PE, CD56-APC, CD107a-PE («Beckman Coulter») и соответствующих изотипических контролей. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток. Экспрессию молекул CD107a определяли после 4 ч инкубирования, всех остальных молекул — через 24 ч.

Для оценки внутриклеточной продукции цитокинов цельную кровь инкубировали с 10 мкг/мл ЛПС или ЭПС в присутствии 2 мкмоль/л моненсина (Sigma) при температуре 37°C (4 ч — для определения внутриклеточного ИЛ-12 в моноцитах; 20 ч — для выявления ИФН- γ в NK-клетках) в полистироловых 12×75 мм пробирках с пробками (Falcon). Нестимулированный контроль инкубировали в тех же условиях в присутствии моненсина без добавления активаторов. После инкубации клетки окрашивали антиген-специфическими моноклональными антителами для поверхностных маркеров (CD3-FITC, CD56-APC), лизировали эритроциты (BD FACS Lysing Solution), клетки пермеабелизовали (BD FACS Permeabilizing Solution) и отмывали. Для выявления внутриклеточных цитокинов добавляли конъюгированные с PE МКА к IL-12, или IFN- γ . После отмывки клетки ресуспендировали в 500 мкл 1% раствора параформальдегида и анализировали образцы на проточном цитометре [8]. При гейтировании популяцию моноцитов выделяли по CD14 в комбинации с боковым светорассеянием (SSC). NK-клетки идентифицировали как CD3-CD56+ клетки. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток. Результаты представлены как процент NK-клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры. Плотность (количество) молекул на поверхности клеток отра-



Влияние гликополимеров *P. nigrifaciens* на изменение внутриклеточного синтеза IL-12 моноцитами крови человека

Уровень экспрессии молекул на поверхности натуральных киллеров после инкубации с гликополимерами *P.nigrifaciens*

Маркеры	Концентрация ЛПС и ЭПС, мкг/мл	Контроль		ЛПС		ЭПС		Контроль		ЛПС		ЭПС	
		% клеток, экспрессирующих маркеры						средняя интенсивность флуоресценции (MFI)					
		Me (Min—max)		Me (Min—max)		Me (Min—max)		Me (Min—max)		Me (Min—max)		Me (Min—max)	
CD69	10	25,8 (6,3—29,2)		47,5* (45,8—56,2)		72,6* (64,1—79,7)		9,4 (8,2—11,4)		21,4* (18,9—23,3)		95,3* (89,3—97,2)	
	100			83,4* (71,4—89,6)		95,8* (90,4—97,3)				70,2* (64,9—72,6)		234* (215,1—241,0)	
CD11b	10	94,3 (85,5—96,7)		95,2 (89,6—97,5)		96,5 (90,3—98,2)		130 (125,2—133,2)		137 (133,1—141,0)		160* (152,7—163,6)	
	100			95,6 (90,6—97,9)		97,3 (93,1—98,6)				139* (136,1—146,3)		207* (201,3—212,1)	
CD25	10	2,1 (1,8—3,1)		3,5 (2,1—4,6)		25,1* (18,5—27,4)		1,2 (1,0—1,4)		1,5 (1,3—1,8)		2,8* (2,4—3,1)	
	100			14,1* (11,6—18,4)		27,8* (22,5—32,7)				4,5* (2,5—7,1)		33,9* (29,4—38,2)	
CD54	10	45,2 (35,6—52,0)		50,5 (47,3—56,3)		63,4* (59,1—67,5)		8,6 (6,2—9,4)		9,1 (7,7—11,4)		13,3* (11,6—16,7)	
	100			79,6* (71,3—82,1)		86,2* (83,4—91,3)				16,7* (12,1—19,7)		24,4* (21,1—28,4)	
HLA-DR	10	4,9 (2,5—5,7)		6,1 (5,1—8,2)		8,4 (5,6—11,2)		4,3 (2,5—6,3)		4,7 (3,1—6,3)		5,8 (4,1—6,8)	
	100			14,4* (10,7—17,4)		18,1* (15,6—24,1)				6,2 (4,2—8,40)		8,3* (6,8—10,9)	

Примечание. Me — медиана; (Min—max) — минимальное и максимальное значение; * — различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) по отношению к контролю.

жена в виде условных единиц средних интенсивностей флуоресценции (MFI).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики, включающими расчёт медианы и квартильного размаха (разность значений 75-го и 25-го процентиля), а также оценку различий с использованием критерия Вилкоксона для связанных групп.

Результаты и обсуждение

Моноциты человека в ответ на бактериальные продукты могут продуцировать различные цитокины, в том числе IL-12 — плеiotропный цитокин, оказывающий влияние на различные биологические эффекты Т-клеток и натуральных киллеров [9]. Инкубирование цельной крови в течение 4 ч как с ЛПС, так и с ЭПС в концентрации 10 мкг/мл приводило к значимому увеличению относительного количества моноцитов, синтезирующих IL-12 внутри клеток (рисунок). Более выраженный эффект оказывал ЭПС, увеличивая процент синтезирующих IL-12 моноцитов до $25,5 \pm 3,8\%$ (контроль — $2,5 \pm 1,1\%$), в то время как ЛПС повышал этот показатель до $9,4 \pm 2,3\%$.

IL-12 является сильным индуктором синтеза IFN- γ Т-лимфоцитами и NK-клетками периферической крови и способствует активизации цитолитической активности NK-клеток [10]. Через 20 ч инкубации клеток крови с 10 мкг/мл ЭПС относительное количество NK-клеток, синтезирующих IFN- γ , возрастало до $21,2 \pm 3,4\%$ при контрольном показателе $3,9 \pm 2,1\%$. ЛПС оказывал меньший эффект, увеличивая процент IFN- γ -позитивных NK-клеток до $8,3 \pm 1,7\%$. Различия статистически значимы ($p \leq 0,05$) по отношению к контролю.

При активации NK-клеток на их мембране регистрируется экспрессия маркера CD107a, который характеризуется как трансмембранный белок LAMP-1 (lysosomal associated membrane protein1) и является маркером дегрануляции клеток [11]. Инкубация клеток крови с 10 мкг/мл ЭПС в течение 4 ч приводила к увеличению относительного количества NK-клеток, экспрессирующих на поверхности CD107a, до $9,1 \pm 1,7\%$ (контроль — $0,8 \pm 0,9\%$). ЛПС увеличивал относительное количество субпопуляции CD107a-позитивных NK-клеток до $7,1 \pm 0,9\%$.

Стимуляция различными веществами может приводить NK-клетки не только к быстрому эффекторному ответу в виде контактного цитолиза с помощью цитотоксических гранул, но и к изменению их фенотипа и функциональных свойств.

В экспериментах показано (таблица), что инкубация клеток крови с ЛПС или ЭПС в течение 24 ч приводила к изменению субпопуляционного состава NK-клеток: увеличивалось относительное число клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD69) и поздней (CD25, HLA-DR) активации, а

также молекул адгезии (CD54) на мембране клеток; возрастала плотность интегринов (CD11b). ЭПС оказывал более выраженное действие на изменение фенотипа НК-клеток, чем ЛПС. Роль всех этих маркеров на НК-клетках связана с осуществлением цитотоксической функции [12–17].

Трансмембранный гликопротеин CD69 является одним из самых ранних поверхностных маркеров активированных НК-клеток, который необходим для проведения сигнала внутрь клетки и повышения функциональной активности НК-клеток. Лимфоциты, в том числе НК-клетки, в интактном состоянии не экспрессируют CD69, эти молекулы появляются на их поверхности после активации клеток различными стимулами. Известно, что экспрессия CD69 на НК-клетках связана с их цитотоксической функцией. Установлена роль CD69 в лизисе, осуществляемом активированными НК-клетками. Кроме того CD69 принимает участие в регулировании других функций НК-клеток, таких как пролиферация, продукция ФНО- α и экспрессия других функционально значимых антигенов (CD25, ICAM-1). [12]. CD69 имеет прямое отношение к активации генов, ответственных за синтез интерлейкина-2, и сигналы, поступающие с CD69, вызывают увеличение как продукции этого цитокина, так и количества рецепторов к нему на клетках CD25+ [13], экспрессию которых принято считать одной из ключевых стадий процесса активации.

ЭПС вызывал более значительное повышение экспрессии CD25 на НК-клетках, чем ЛПС и, соответственно, в большей степени увеличивал возможность проявления цитотоксических свойств НК-клеток, т.к. известно, что экспрессия CD25 позитивно коррелирует с цитотоксической функцией НК-клеток, увеличивая их дегрануляцию и процент гибели клеток-мишеней, а также продукцию ИФН- γ [14].

Система HLA обеспечивает регуляцию иммунного ответа. НК-клетки, экспрессирующие HLA-DR, характеризуются сильной литической активностью и играют значительную роль в процессах инициации и усиления воспалительных реакций.

CD11b является важным интегрином, который связан с созреванием и цитотоксичностью НК-клеток [15].

Молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 (CD54) экспрессируются на клетках крови при активации и участвуют в обеспечении адгезии и миг-

рации клеток в очаг воспаления [16]. Молекулы CD54, экспрессирующиеся на НК-клетках, участвуют в регулировании процесса цитолиза [17].

Таким образом, увеличение экспрессии молекул CD69, CD25, HLA-DR, CD11b и CD54 на НК-клетках связано с возрастанием их цитотоксического потенциала.

Известно, что активация одного типа клеток может приводить к активации другого, причём активирующее действие НК-клеток на моноцитарно-макрофагальные клетки связано, главным образом, с секрецией IFN- γ , а моноцитарно-макрофагальные клетки стимулируют натуральные киллеры с помощью цитокинов IL-12, IL-15 и IL-18 и контактных взаимодействий.

Анализ результатов экспериментов позволяет предположить, что ЛПС и ЭПС, выделенные из *P.nigrifaciens*, оказывают прямое действие на моноциты крови через паттерн-распознающие рецепторы, увеличивая относительное количество моноцитов, синтезирующих IL-12 уже через 4 ч инкубации. Наблюдаемая активация НК-клеток и увеличение их цитотоксичности могут быть связаны как с прямым воздействием исследуемых гликополимеров, так и с влиянием IL-12, который может приводить к запуску продукции IFN- γ и индуцировать экспрессию активационных маркеров.

В связи с тем, что НК-клеткам принадлежит важная роль в иммунологическом надзоре, а ЛПС и ЭПС морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* являются индукторами НК-клеточной активности, представляется перспективным дальнейшее исследование этих гликополимеров и создание на их основе фармакологических противовирусных и противоопухолевых препаратов.

Выводы

1. ЛПС и ЭПС, выделенные из морских бактерий *P.nigrifaciens*, оказывают влияние на регуляторную способность моноцитов, увеличивая их способность синтезировать IL-12.

2. Под действием ЛПС и ЭПС возрастает количество НК-клеток, синтезирующих ИФН- γ .

3. ЛПС и ЭПС усиливают цитотоксический потенциал НК-клеток увеличивая экспрессию молекул CD107a, CD69, CD25, HLA-DR, CD11b и CD54.

4. ЭПС оказывает более эффективное, чем ЛПС, действие на изменение функциональной активности моноцитов и НК-клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farag S.S., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; 20: 123–137.
2. Goodier M. R., Londei M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56 + CD3 — NK cells: a regulatory role of monocytes and IL-10. *J.Immunol* 2000; 165: 139–147.
3. Alba S., Nazarenko E.L., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A. Molecular Structure of Endotoxins from Gram-negative Marine Bacteria: An Update Serena Leone. *Mar Drugs* 2007; 5 (3): 85–112.
4. Bowman J.P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs* 2007; 5: 220–241. doi:10.3390/md504220 · Source: PubMed
5. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Исаков В.В. Установление структуры липида А из морской грамтрицательной бактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393т. *Биоорган хим* 2004; 30 (4): 409–416. / Krasikova I.N., Kapustina N.V., Isakov V.V. Ustanovlenie struktury lipida A iz morskoj gramotricatel'noj bakterii *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATSS 14393t. *Bioorgan him* 2004; 30 (4): 409–416. [in Russian]
6. Смолина Т.П., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Изменение уровня экспрессии молекул адгезии клеток врожденного иммунитета человека гликополимерами морских бактерий. *Антибиотики и химиотер* 2015; 60, 3–4: 37–41. / Smolina T.P., Zaporozhec T.S., Besednova N.N. Izmenenie urovnja jekspressii molekul adgezii kletok vrozhdjonnogo immuniteta cheloveka glikopolimerami morskih bakterij. *Antibiotiki i himioter* 2015; 60, 3–4: 37–41. [in Russian]
7. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Зубков А.А. и др. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonashaloplanktis* KMM156. *Биоорган хим* 1993; 19 (3): 327–336. / Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov A.A. i dr. Struktura povtorjajushhegosja zvena kislogo polisaharida *Alteromonashaloplanktis* KMM156. *Bioorgan him* 1993; 19 (3): 327–336. [in Russian]
8. Foster B., Prussin C., Liu F., Whitmire J.K., Whitton J.L. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2007; Aug; Chapter 6: Unit 6.24. doi: 10.1002/0471142735.im0624s78.
9. Chehimi J., Trinchieri G. Interleukin-12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1994; 14: 149–161.
10. Wolf S.F., Sieburth D., Sypek J. Interleukin-12: a key modulator of immune function. *Stem Cells Dayt* 1994; 12 (2): 154–68.
11. Betts M.R., Koup R.A. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol* 2004; 75: 497–512. doi: 10.1016/S0091-679X(04)75020-7
12. Borrego F., Robertson M.J., Ritz J., Pena J., Solana R. CD69 is stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect. *Immunol* 1999; 97: 159–165.
13. Marzio R., Mauël J., Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 21; 3: 565–582.
14. Rudnicka K., Matusiak A., Chmiela M. CD25 (IL-2R) expression correlates with the target cell induced cytotoxic activity and cytokine secretion in human natural killer cells. *Acta Biochim Pol* 2015; 62 (4): 885–894. doi: 10.18388/abp.2015_1152.
15. Fu B., Tian Z., Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* 2014; 141: 4: 483–489.
16. Zimmerman T., Blanco F.J. Inhibitors targeting the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion interaction: design and mechanism of action. *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14; 22: 2128–2139.
17. Robertson M.J., Caligiuri M.A., Manley T.J., Levine H., Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *Immunol* 1990; 15; 145 (10): 194–201.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смолина Татьяна Павловна — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Запорожец Татьяна Станиславовна — д.м.н., с.н.с. (звание), зам. директора по науке НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Беседнова Наталья Николаевна — д.м.н., академик РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Антиоксидантные свойства водорастворимых полисахаридов и этанольных экстрактов мицелия ксилотрофных базидиальных грибов

Н. Р. АЛМЯШЕВА*, М. С. ЯРИНА, А. В. ГОЛЫШКИН, Б. Р. ДЖАВАХЯН, Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ

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

Antioxidant Properties of Water-Soluble Polysaccharides and Ethanolic Extracts of Xylotrophic Basidiomycetes Mycelium

N. R. ALMYASHEVA, M. S. YARINA, A. V. GOLYSHKIN, B. R. DZHAVAKHYAN, L. M. KRASNOPOLSKAYA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

В настоящей работе проведено исследование антиоксидантных свойств фракций водорастворимых полисахаридов и этанольных экстрактов погруженного мицелия базидиальных грибов *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer и *Hericium erinaceus* (Bull) Persoon. С этой целью использовали методы определения хелатирующей способности по отношению к ионам двухвалентного железа, антирадикальной активности по отношению к ДФПГ и ингибирующего действия на реакцию жидкофазного окисления олеиновой кислоты. Последний метод применяли только в исследовании этанольных экстрактов мицелия базидиомицетов. Выделенные из мицелия *G. lucidum* и *F. velutipes* водорастворимые полисахариды и низкомолекулярные соединения, растворимые в этаноле, обладали высокой хелатирующей способностью, величины ЕС₅₀ данных образцов были сопоставимы с эффективностью контроля (ЭДТА-Na₂). Все исследованные этанольные экстракты обладали антирадикальной активностью по отношению к ДФПГ и ингибировали перекисное окисление олеиновой кислоты. Этанольный экстракт мицелия *H. erinaceus* отличался максимальным антирадикальным эффектом и способностью к деградации гидропероксидов. Фракции полисахаридов, полученные в условиях эксперимента, не показали антирадикальной активности.

Ключевые слова: антиоксидантные свойства, базидиомицеты, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, полисахариды, этанольные экстракты, мицелий.

The present study was conducted to investigate the antioxidant properties of water-soluble polysaccharides and ethanolic extracts of submerged mycelium of basidiomycetes *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer and *Hericium erinaceus* (Bull) Persoon. For this purpose, DPPH radical-scavenging activity assay, ferrous ions chelating assay and oleic acid peroxidation assay were applied. The last method was used only to investigate the antioxidant properties of ethanolic extracts. Water-soluble endo-polysaccharides and ethanol-soluble low molecular compounds of *G. lucidum* and *F. velutipes* mycelium showed high chelating capacity which was comparable to the EDTA-Na₂ (control group). All ethanolic extracts proved to have antiradical activity and oleic acid peroxidation capacity. Ethanolic extract of *H. erinaceus* mycelium showed maximum DPPH free radical-scavenging activity and could decompose hydroperoxides. Antiradical activity of water-soluble polysaccharides was not detected.

Keywords: antioxidant properties, basidiomycetes, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, polysaccharides, ethanolic extracts, mycelium.

Введение

В последнее время повышен интерес к изучению роли активных форм кислорода (АФК) в патогенезе различных заболеваний. С одной стороны, АФК образуются в ходе естественных физиологических процессов и необходимы для поддержания иммунной системы организма, передачи клеточных сигналов и синтеза гормонов. С другой стороны, окислительный стресс, вызванный высо-

кими концентрациями прооксидантов, может привести к повреждению белков, клеточных мембран и нуклеиновых кислот [1]. Наиболее выражены последствия свободно-радикального повреждения клеток при сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, бронхолегочных и онкологических заболеваниях [2–4].

Необходимый уровень АФК поддерживается антиоксидантной системой защиты организма, включающей ферментные (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза) и неферментные (аскорбиновая кислота, витамин Е, убихинон и др.) составляющие [5]. Однако в ряде

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: E-mail: almyashevanelya@mail.ru

случаев эта система защиты не срабатывает, что приводит к возникновению патологического процесса. Перспективным направлением исследований является разработка лекарственных средств, восстанавливающих антиоксидантно-прооксидантный баланс. Известен препарат Мексидол, способный как повышать активность антиоксидантных ферментов, так и ингибировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6]. Выраженные антиоксидантные свойства также отмечены у метаболического средства Цитофлавин, содержащего компоненты природного происхождения (янтарная кислота, инозин, витамины B₂ и PP). Приём препарата в 97% случаев способствовал снижению абсолютного количества малонового диальдегида (один из основных показателей уровня протекания ПОЛ) в сыворотке крови больных диабетом в 2 раза. Кроме того, установлено положительное влияние Цитофлавина на активность каталазы [7].

Базидиальные грибы являются продуцентами широкого спектра биологически активных соединений, таких как полисахариды, фенольные кислоты, флавоноиды, терпены, стероиды и др., которые можно рассматривать как потенциальные антиоксиданты [8–10]. В настоящей работе проведено исследование антиоксидантных свойств фракций водорастворимых полисахаридов и этанольных экстрактов погруженного мицелия базидиальных грибов *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer и *Hericium erinaceus* (Bull) Persoon.

Материал и методы

Реактивы. Глюкоза и агар-агар были приобретены у ООО «НТК ДИАЭМ» (Россия), олеиновая кислота, дигидрофосфат калия, сульфат магния, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА-Na₂), ДМСО (диметилсульфоксид) и хлорид железа (II) — у ООО «Русхим», 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) и феррозин — у «Sigma-Aldrich» (США). Для приготовления питательных сред использовали полуобезжиренную соевую муку и оливковое масло пищевого качества.

Штаммы и условия культивирования. В работе использовали штаммы базидиомицетов *G. lucidum*, *F. velutipes* и *H. erinaceus* из коллекции лаборатории биологически активных соединений ФГБУ «НИИНА». Рабочие культуры хранили на скошенном картофельно-глюкозном агаре при 4°C.

Погруженное культивирование базидиомицетов проводили в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл, содержащих 100 мл среды, при 220 об/мин и температуре 28°C. Объём посевного материала составлял 10% объёма ферментационной среды. Ферментационная среда для *H. erinaceus* содержала (г/л водопроводной воды): глюкозу — 20,0; соевую муку — 15,0; дигидрофосфат калия — 2,5 и сульфат магния — 0,25. *G. lucidum* и *F. velutipes* выращивали на оптимизированных питательных средах [11, 12]. В качестве посевного материала использовали культуры, выращенные в описанных выше условиях на среде, содержащей (г/л водопроводной воды): глюкозу — 20,0; соевую муку — 10,0; дигидрофосфат калия — 2,5 и сульфат магния — 0,25 в течение 3–7 сут [8].

Биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через лавсановую ткань, промывали дистиллированной водой, высушивали при 45°C в течение суток и измельчали.

Подготовка образцов. Навеску порошка биомассы (1 г на 100 мл) дважды экстрагировали 80% этанолом на водяной бане, нагретой до 80°C, в течение 30 мин. Экстракты объединяли и центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин, супернатанты упаривали на ротационном испарителе до постоянной массы. Сухой остаток растворяли в 80% этаноле в концентрации 5 мг/мл. Содержание фенольных соединений в этанольных экстрактах определяли с использованием реагента Фолина и Чиокальто и галловой кислоты (ГК) в качестве стандарта [13].

Для получения суммарных фракций водорастворимых полисахаридов навеску порошка биомассы (3,6 г на 100 мл) экстрагировали дистиллированной водой при 121°C в течение 60 мин. Экстракты центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин. Полисахаридные фракции высаживали из супернатанта четырёхкратным объёмом этанола при 4°C, диализовали против дистиллированной воды в течение суток и лиофильно высушивали, выход определяли гравиметрически. Содержание белка во фракциях водорастворимых полисахаридов определяли методом Бредфорд. Фракции водорастворимых полисахаридов растворяли в дистиллированной воде и ДМСО в концентрации 5 мг/мл.

Определение хелатирующей способности по отношению к ионам железа. В качестве исследуемых образцов использовали растворы фракций водорастворимых полисахаридов в дистиллированной воде и этанольные экстракты в концентрациях от 0,01 до 2,0 мг/мл. В пробирке смешивали 1 мл анализируемого раствора, 3,7 мл метанола или дистиллированной воды, 100 мкл водного раствора FeCl₂ (2 мМ) и 200 мкл водного раствора феррозина (5 мМ). Реакционную смесь выдерживали при 25°C в течение 10 мин, после чего определяли оптическую плотность при 562 нм [14]. Хелатирующую способность оценивали по величине ЕС₅₀, соответствующей концентрации исследуемого образца, необходимой для снижения содержания ионов двухвалентного железа на 50% от исходного значения.

Определение антирадикальной активности. В качестве исследуемых образцов использовали растворы фракций водорастворимых полисахаридов в ДМСО и этанольные экстракты в концентрациях от 0,5 до 5,0 мг/мл. Антирадикальную активность определяли спектрофотометрическим методом по отношению к ДФПГ. В кювете смешивали 100 мкл анализируемого раствора и 900 мкл раствора ДФПГ (6×10⁻⁵ М) в соответствующем растворителе. Реакционную смесь выдерживали в темноте при 25°C в течение 60 мин, после чего определяли оптическую плотность при 527 нм. Антирадикальную активность оценивали по величине ЕС₅₀, соответствующей концентрации исследуемого образца, необходимой для снижения содержания ДФПГ на 50% от исходного значения.

Проведение жидкофазного окисления олеиновой кислоты. Окисление олеиновой кислоты в присутствии этанольных экстрактов (1 мг/мл) проводили в термостатируемой ячейке (60°C) при скорости подачи воздуха 2–4 мл/мин в течение 5 ч. Барботаж воздухом проводили в течение 2 ч перед введением этанольных экстрактов. Ингибирующую способность образцов в процессе окисления олеиновой кислоты оценивали стандартным методом по количеству образующихся изомерных гидропероксидов L'OOH [15].

Для статистической обработки полученных результатов использовали программу MS Excel.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе источником биологически активных метаболитов, таких как водорастворимые полисахариды и низкомолекулярные соединения, являлся погруженный мицелий *F. velutipes*, *G. lucidum* и *H. erinaceus*. Для определения оптимального времени культивирования были исследованы особенности роста базидиомицетов на

жидких питательных средах (рис. 1). Максимальный выход воздушно-сухой биомассы *H.erinaceus* составил 16,3 г/л и был получен через 144 ч культивирования, *F.velutipes* и *G.lucidum* — 35,4 и 18,2 г/л соответственно через 120 ч. Погруженный мицелий *H.erinaceus* отличался наибольшим содержанием водорастворимых полисахаридов, составившим 1,88 %. Наиболее высокий выход водорастворимых полисахаридов в расчёте на литр культуральной среды обеспечивала погруженная культура *F.velutipes* за счёт интенсивного накопления биомассы (табл. 1). Суммарное содержание в мицелии *F.velutipes* и *G.lucidum* соединений, растворимых в этаноле, превышало 30%, в то время как в случае *H.erinaceus* составило 22,8% (табл. 2).

Поскольку антиоксиданты могут обладать разными механизмами действия, изучение их активности целесообразно проводить с использованием нескольких методов. В работе антиоксидантные свойства метаболитов базидиальных грибов оценивали тремя методами: методом хелатирования ионов железа, методом определения антирадикальной активности в отношении ДФПГ и методом ингибирования реакции жидкофазного окисления олеиновой кислоты. Выбор методов обусловлен тем, что избыток ионов двухвалентного железа в клетках катализирует образование активных гидроксильных радикалов — основных инициаторов реакций окисления биомолекул, а для обрыва развивающейся цепи необходимы соединения, проявляющие антирадикальные свойства. Окисление ненасыщенных жирных кислот кислородом воздуха является модельной реакцией перекисного окисления липидов клеточных мембран. По изменению скорости накопления гидропероксидов в ходе процесса можно предположить механизм действия антиоксидантов.

С помощью двух методов определения антиоксидантных свойств, основанных на способности хелатировать ионы железа или антирадикаль-

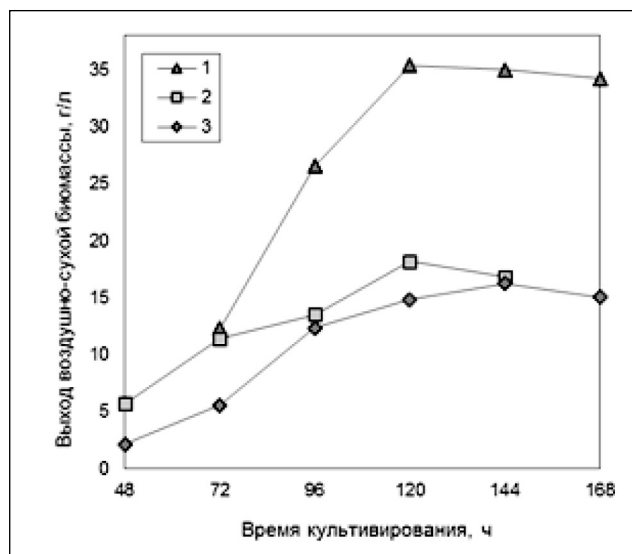


Рис. 1. Кинетические кривые накопления биомассы при погруженном культивировании *F.velutipes* (1), *G.lucidum* (2), *H.erinaceus* (3).

ной активности в отношении ДФПГ, были исследованы суммарные фракции водорастворимых полисахаридов и этанольные экстракты погруженного мицелия базидиальных грибов. Метод ингибирования реакции жидкофазного окисления олеиновой кислоты применяли только при работе с этанольными экстрактами.

Анализ экспериментальных результатов, полученных при исследовании суммарных фракций водорастворимых полисахаридов (см. табл. 1), показал, что все фракции способны хелатировать ионы двухвалентного железа. Наибольшая хелатирующая способность была отмечена у фракции водорастворимых полисахаридов *G.lucidum*, значение EC_{50} которой составило 1,17 мг/мл и превышало значение EC_{50} комплексона ЭДТА- Na_2 (2,09 мг/мл). Близкую эффективность проявила

Таблица 1. Антиоксидантные свойства суммарных фракций водорастворимых полисахаридов базидиомицетов

Базидиомицет	Содержание водорастворимых полисахаридов в мицелии, %	Выход водорастворимых полисахаридов, г/л культуральной среды	Антиоксидантные свойства (EC_{50}), мг/мл	
			хелатирующая способность по отношению к Fe^{2+}	антирадикальная активность по отношению к ДФПГ
<i>G.lucidum</i>	1,29	0,24±0,04	1,17±0,03	0
<i>F.velutipes</i>	1,75	0,62±0,07	2,33±0,11	0
<i>H.erinaceus</i>	1,88	0,28±0,03	9,83±0,01	0

Примечание. «0» — активность не обнаружена.

Таблица 2. Антиоксидантные свойства этанольных экстрактов мицелия базидиомицетов

Базидиомицет	Содержание в мицелии соединений растворимых в этаноле, %	Содержание фенольных соединений, мг эквивалентов ГК/г этанольного экстракта	Антиоксидантные свойства (EC_{50}), мг/мл	
			хелатирующая способность по отношению к Fe^{2+}	антирадикальная активность по отношению к ДФПГ
<i>G.lucidum</i>	33,10	12,13±1,11	1,14±0,17	1,15±0,06
<i>F.velutipes</i>	33,48	13,30±0,28	1,45±0,28	1,64±0,05
<i>H.erinaceus</i>	22,80	15,98±3,62	2,11±0,13	0,65±0,02

фракция водорастворимых полисахаридов *F.velutipes* (2,33 мг/мл), в то время как хелатирующая способность водорастворимых полисахаридов *H.erinaceus* была существенно ниже.

Антирадикальная активность не была обнаружена ни у одного из исследованных образцов водорастворимых полисахаридов из мицелия базидиомицетов (см. табл. 1). В литературе имеются данные об антирадикальной активности водорастворимых полисахаридов *G.lucidum*, *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor* и *Schizophyllum commune*, выделенных из их плодовых тел [16, 17]. Поскольку максимальный эффект был получен при изучении фракции полисахаридов *G.lucidum*, содержащей наибольшее количество β -глюканов, авторы предположили, что антирадикальная активность обусловлена наличием во фракциях полисахаридов этих соединений. Таким образом, для дальнейшей работы требуется детальное изучение состава суммарных полисахаридных фракций базидиомицетов.

Этанольные экстракты базидиомицетов показали широкий спектр антиоксидантных свойств, проявив активность в опытах с использованием всех трёх методов. Наибольшая хелатирующая способность по отношению к ионам двухвалентного железа, как и в случае высокомолекулярных метаболитов, была отмечена у этанольных экстрактов мицелия *G.lucidum* и *F.velutipes* и превышала эффективность ЭДТА- Na_2 (табл. 2). Максимальное значение антирадикальной активности было получено при исследовании экстракта мицелия *H.erinaceus*, содержащего в 1 г 15,98 мг эквивалентов галловой кислоты. Показатель EC_{50} данного образца составил 0,65 мг/мл и был сопоставим со значением EC_{50} аскорбиновой кислоты (0,10 мг/мл). Величина антирадикальной активности коррелировала с содержанием фенольных соединений в экстрактах базидиомицетов.

На рис. 2 представлены результаты эксперимента по окислению олеиновой кислоты в присутствии этанольных экстрактов погруженного мицелия базидиомицетов. Этанольный экстракт *F.velutipes*, ранее проявивший наименьшую антирадикальную активность, оказался не способен эффективно ингибировать процесс окисления олеиновой кислоты, о чем свидетельствует увеличение концентрации гидропероксидов на кинетической кривой. Полное ингибирование процесса окисления олеиновой кислоты было отмечено для экстрактов *G.lucidum* и *H.erinaceus*, однако только в присутствии экстракта *H.erinaceus*, было отмечено снижение концентрации гидропероксидов, находящихся в олеиновой кислоте на начальный момент времени. Способность к деструкции гидропероксидов делает *H.erinaceus* перспектив-

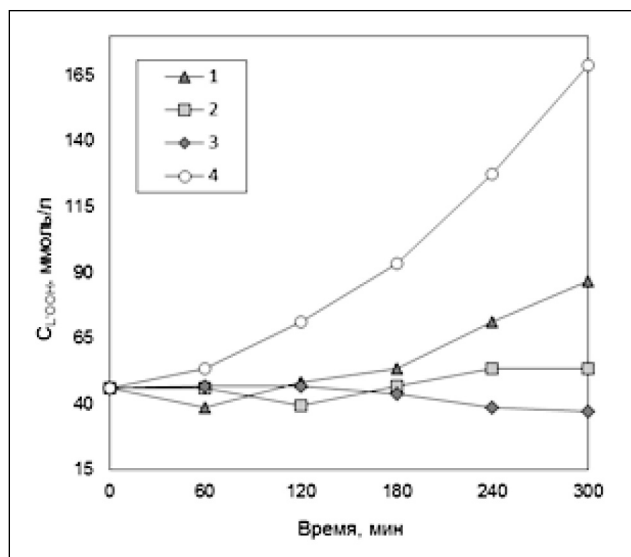


Рис. 2. Кинетические кривые накопления гидропероксидов при окислении олеиновой кислоты при 60°C в присутствии экстрактов мицелия (1 мг/мл) *F.velutipes* (1), *G.lucidum* (2), *H.erinaceus* (3) и без добавления экстрактов (4).

ным продуцентом метаболитов с мембранопротекторными свойствами.

Выводы

1. Обнаружены антиоксидантные свойства у метаболитов из погруженного мицелия *F.velutipes*, *G.lucidum*, *H.erinaceus*: водорастворимых полисахаридов и низкомолекулярных соединений, растворимых в этаноле.

2. Водорастворимые полисахариды из мицелия изученных штаммов базидиомицетов способны хелатировать ионы двухвалентного железа. Максимальная хелатирующая способность отмечена у полисахаридов *G.lucidum*, причём величина EC_{50} данного образца превышала эффективность ЭДТА- Na_2 . Фракции полисахаридов, полученные в условиях эксперимента, не показали антирадикальной активности.

3. Этанольные экстракты мицелия изученных штаммов базидиомицетов обладают широким спектром антиоксидантных свойств. Наибольшую хелатирующую способность проявил этанольный экстракт *G.lucidum*, наименьшую — *H.erinaceus*. В то же время антирадикальная активность экстракта *H.erinaceus* значительно превышала активность экстрактов *G.lucidum* и *F.velutipes* и была сопоставима с активностью аскорбиновой кислоты. Исследование ингибирующей способности этанольных экстрактов на процесс окисления олеиновой кислоты показало, что *H.erinaceus* является перспективным продуцентом веществ, способных к деструкции гидропероксидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dasgupta A., Klein K. Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment of Disease. Academic Press 2014; 344.
2. Palacio C., Mooradian A.D. Clinical trials and antioxidant outcomes. Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease 2016; 493–506.
3. Christofidou-Solomidou M., Muzykants V.R. Antioxidant strategies in respiratory medicine. Treatments in respiratory medicine 2006; 5: 1: 47–78.
4. Gorrini C., Harris I.S., Mak T.W. Modulation of oxidative stress as an anti-cancer strategy. Nature reviews Drug discovery 2013; 12: 12: 931–947.
5. Горошко О.А., Кулес В. Г., Прокофьев А.Б., Архипов В.В. и Демченкова Е. Ю. Клинико-фармакологические аспекты применения антиоксидантных лекарственных средств. Международ журн прикладных и фундаментальных исследований 2016; 4: 5: 905–912. / Goroshko O.A., Kules V. G., Prokof'ev A.B., Arkhipov V.V. i Demchenkova E. Ju. Kliniko-farmakologicheskie aspekty primenenija antioksidantnykh lekarstvennykh sredstv. Mezhdunarod zhurn prikladnykh i fundamental'nykh issledovanij 2016; 4: 5: 905–912. [in Russian]
6. Воронина Т. А. Мексидол. Основные нейрорепаративные эффекты и механизм действия. Фарматека 2009; 180: 6: 1–4. / Voronina T. A. Meksidol. Osnovnye nejropsikhotropnye jeffekty i mekhanizm dejstva. Farmateka 2009; 180: 6: 1–4. [in Russian]
7. Маркевич П.С., Маркевич Л.Б., Даниленко С.В., Плеханов А.Н. Опыт применения препарата «Цитофлавин» у больных синдромом диабетической стопы. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН 2013; 2: 90: 34–37. / Markevich P.S., Markevich L.B., Danilenko S.V., Plekhanov A.N. Opyt primenenija preparata «Citoflavin» u bol'nykh sindromom diabeticheskoy stopy. Bjulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdelenija RAMN 2013; 2: 90: 34–37. [in Russian]
8. Автономова А.В., Леонтьева М.И., Исакова Е.Б., Белицкий И.В., Усов А.И., Бухман В.М., Лапин А.А., Краснопольская Л.М. Противоопухолевые и антиоксидантные свойства полисахаридных экстрактов и фракций биомассы базидиомикета *Hypsizygus ulmarius*, полученной путем глубокого культивирования. Биотехнология 2008; 2: 23–29. / Avtonomova A.V., Leont'eva M.I., Isakova E.B., Belickij I.V., Usov A.I., Bukhman V.M., Lapin A.A., Krasnopol'skaja L.M. Protivoopukholevyje i antioksidantnye svojstva polisaharidnykh ekstraktov i frakcij biomassy bazidiomiceta *Hypsizygus ulmarius*, poluchЕННОj putem glubinnogo kul'tivirovanija. Biotekhnologija 2008; 2: 23–29. [in Russian]
9. Краснопольская Л.М., Шуктеева М.И., Автономова А.В., Ярина М.С., Джавахян Б.Р., Исакова Е.Б., Бухман В.М. Противоопухолевые и антиоксидантные свойства водорастворимых полисахаридов из мицелия базидиального гриба *Flammulina velutipes*. Антибиотики и химиотер 2016; 61: 11–12. / Krasnopol'skaja L.M., Shukhtueva M.I., Avtonomova A.V., Jarina M.S., Dzjavakhjan B.R., Isakova E.B., Bukhman V.M. Protivoopukholevyje i antioksidantnye svojstva vodorastvorimyx polisaharidov iz micelija bazidial'nogo гриба *Flammulina velutipes*. Antibiotiki i khimioter 2016; 61: 11–12. [in Russian]
10. Ярина М.С., Автономова А.В., Шуктеева М.И., Лапин А.А., Краснопольская Л.М. Антиоксидантные свойства погруженного мицелия базидиального гриба *Ganoderma lucidum*. Актуальные проблемы нанобиотехнологии и инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов 2013: 26–29. / Jarina M.S., Avtonomova A.V., Shukhtueva M.I., Lapin A.A., Krasnopol'skaja L.M. Antioksidantnye svojstva pogruzhennogo micelija bazidial'nogo гриба *Ganoderma lucidum*. Aktual'nye problemy nanobiotehnologii i innovacij s netradicionnymi prirodnyimi resursami i sozdanija funkcional'nykh produktov 2013: 26–29. [in Russian]
11. Автономова А.В., Краснопольская Л.М., Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Микробиология 2006; 75: 2: 186–192. / Avtonomova A.V., Krasnopol'skaja L.M., Maksimov V.N. Optimizacija sostava pitatel'noj sredy dlja pogruzhennogo kul'tivirovanija *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Mikrobiologija 2006; 75: 2: 186–192. [in Russian]
12. Шуктеева М.И., Автономова А.В., Масютин Я.А., Новиков А.А., Краснопольская Л.М. Погруженное культивирование *Flammulina velutipes* и химический состав мицелия. Башкирский хим журн 2011; 18: 4: 144–148. / Shukhtueva M.I., Avtonomova A.V., Masjutin Ja.A., Novikov A.A., Krasnopol'skaja L.M. Pogruzhennoe kul'tivirovanie *Flammulina velutipes* i khimicheskij sostav micelija. Bashkirkij khimicheskij zhurnal 2011; 18: 4: 144–148. [in Russian]
13. Barros L., Falcão S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M., Ferreira I.C. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chemistry 2008; 111: 1: 61–66.
14. Dinis T. C. P., Madeira V. M. C., Almeida L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Arch of Biochem Biophys 1994; 315: 1: 161–169.
15. Smolyaninov I. V., Antonova N. A., Poddelsky A. I., Smolyaninova S. A., Osipova V. P., Berberova N. T. Radical scavenging activity of sterically hindered catecholates and o-amidophenolates complexes of LSbVPh3 type. J Organometallic Chem 2011; 696: 13: 2611–2620.
16. Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Vrvic M. M., Todorović N., Jakovljević D., Van Griensven L. J. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. J Food Composition and Analysis 2012; 26: 1: 144–153.
17. Klaus A., Kozarski M., Nikšić M., Jakovljević D., Todorović N., Van Griensven L. J. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. LWT-Food Science and Technology 2011; 44: 10: 2005–2011.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Альмяшева Н.Р. — инженер, лаборатория биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Ярина М.С. — научный сотрудник, лаборатория биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Голышкин А.В. — инженер, лаборатория биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Джавахян Б.Р. — лаборант-исследователь, лаборатория биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Краснопольская Л.М. — д.б.н., зав. лабораторией биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Фармакокинетика оливамида при внутривенном введении крысам и кроликам (пилотное исследование)

Ю. А. ПОРТНОЙ, С. А. ДОВЖЕНКО, М. Б. КОБРИН, М. И. ТРЕЩАЛИН,
В. А. ГОЛОБРОДО, А. Н. ТЕВЯШОВА, А. А. ФИРСОВ*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Pharmacokinetics of Olivamide after Bolus Administration in Rats and Rabbits (a Pilot Study)

YU. A. PORTNOY, S. A. DOVZHENKO, M. B. KOBRIN, M. I. TRESHALIN,
V. A. GOLOBRODO, A. N. TEVYASHOVA, A. A. FIRSOV*

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Изучена фармакокинетика полусинтетического противоопухолевого препарата оливамида — производного оливомидина А — после внутривенного введения крысам и кроликам. Концентрацию оливамида в биопробах определяли методом ВЭЖХ. Снижение уровней оливамида в плазме крови животных носило двухфазный характер. После резкого падения концентрации препарата в течение первых 15 мин, обусловленного быстрым перераспределением оливамида между кровью и периферическими тканями, уровни оливамида снижались медленно вплоть до 24 ч. Значения тканевой доступности оливамида у крыс составляли от 5700% (селезёнка) до 450% (печень). Кумулятивная экскреция неизменённого оливамида с мочой крыс через 8 ч после инъекции составляла 18% от дозы. Усреднённые фармакокинетические профили оливамида в плазме крови животных описывали трехэкспоненциальным уравнением. Значения общего клиренса и стационарного объёма распределения у крыс оказались выше, чем у кроликов (17,9—22,0 против 16,2 мл/(мин×кг) и 7,8—8,7 против 5,1 л/кг, соответственно). Среднее время удержания оливамида у кроликов было меньше, чем у крыс (5,3 против 6,3—7,3 ч). Фармакокинетика оливамида у крыс была линейной.

Ключевые слова: оливамид, фармакокинетика, доклиническое изучение.

The pharmacokinetics of olivamide, a semisynthetic antitumor derivate of olivomycin A, were studied in rats and rabbits after bolus administration. Plasma concentrations of olivamide were determined by an HPLC assay. The decrease in olivamide levels in blood plasma was biphasic in both rats and rabbits. Olivamide levels declined slowly for up to 24 hours after a sharp drop in drug concentration during the first 15 minutes due to the rapid redistribution of olivamide between blood and peripheral tissues. The tissue availability of olivamide in rats ranged from 5700% (spleen) to 450% (liver). Eight-hour cumulative renal excretion of unchanged olivamide in rats was 18% of the dose. A three-exponential equation was used to describe pharmacokinetic profiles of olivamide in rat and rabbit plasma. The total clearance and steady-state volume of distribution in rats were higher than in rabbits (17.9—22.0 vs. 16.2 ml/(min×kg) and 7.8—8.7 vs. 5.1 l/kg, respectively). The mean retention time of olivamide in rabbits was less than in rats (5.3 vs 6.3—7.3 h). Olivamide pharmacokinetics in rats were linear.

Keywords: olivamide, pharmacokinetics, preclinical study.

Введение

Клиническое применение противоопухолевых антибиотиков группы ауреоловой кислоты лимитировано низким терапевтическим индексом. Даже лучший по этому показателю оливомидин А характеризуется высокой токсичностью. В лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА» была проведена оптимизация структуры оливомидина А, которая позволила получить его полусинтетическое производное — N,N-диметиламиноэтиламид 1'-дез-

(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбокси-оливомидина А (оливамид), не уступающее оливомидину А по противоопухолевой активности, но превосходящее его по переносимости [1].

Целью данной работы было получение первичных данных о фармакокинетике оливамида в опытах на животных (крысы и кролики).

Материал и методы

Лабораторные животные, режим введения препарата, регламент отбора образцов биоматериала. Фармакокинетические исследования проводили на половозрелых беспородных самцах крыс с массой тела от 200 до 270 и самцах кроликов породы «Советская шиншилла» с массой тела от 2000 до 2500 г. Оливамид вводили натошак (животные не получали пищи в течение 8 ч до его введения) внутривенно в дозах 1, 2 и 4 мг/кг (крысы) и 0,4 мг/кг (кролики — доза в пересчёте на единицу

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11, строение 1. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе.
E-mail: kindyn@gmail.com

поверхности тела животного соответствует дозе 1 мг/кг у крысы). Раствор препарата готовили непосредственно перед введением путём добавления к готовой лекарственной форме, содержащей 5 мг оливамида, 5 мл 5% раствора глюкозы. Полученный раствор вводили в хвостовую вену крысы или краевую вену уха кролика. Объём вводимого раствора рассчитывали с учётом массы тела каждого животного.

Через 5, 15, 30 мин, 1, 4, 8, 24 и 48 ч после введения препарата крысам в дозе 1 мг/кг проводили эвтаназию животных путём декапитации (для отбора биопроб в каждой временной точке использовали не менее 6 животных). Отбор крови производили в стерильные пластиковые пробирки ёмкостью 1,5 мл, в которые было заранее добавлено по 200 мкл 6% раствора натрия ЭДТА. Кровь центрифугировали в течение 40 мин при 2000 оборотов/мин. Надосадочную жидкость помещали в пробирку типа эппендорф, замораживали и хранили при температуре -20°C до проведения хроматографического анализа.

Органы животных (задняя группа мышц бедра, лёгкие, сердце, почки, печень, селезёнка) выделяли после декапитации, взвешивали, затем гомогенизировали при помощи механических ручных гомогенизаторов и растирали пестиком в ступке с добавлением питательной среды 199 (питательная среда для культуры клеток жидкая, с солями Хенкса и глутамином) в соотношении 1:1 (масса/объём). Готовые гомогенаты тканей органов помещали в бакпечатки, замораживали и хранили при температуре -20°C до проведения хроматографического анализа.

Для отбора мочи крыс помещали в индивидуальные диурезные клетки. Мочу крыс собирали до и через 4 и 8 ч после введения препарата. Измеряли объём мочи, после чего пробы замораживали и хранили при температуре -20°C до проведения хроматографического анализа.

У крыс, которым вводили препарат в дозе 2 и 4 мг/кг, отбирали только пробы крови через те же промежутки времени за исключением точки на 48 ч (по 6 животных на каждую временную точку).

Пробы крови у каждого из 6 кроликов отбирали до и через 5, 15, 30 мин; 1; 4, 8 и 24 ч после введения оливамида при помощи внутрисердечной пункции. Образцы плазмы крови готовили так же, как описано выше.

Количественное определение оливамида в биоматериале. Анализ содержания оливамида в биопробах осуществляли методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Gilson (Gilson, Франция). Непосредственно перед проведением анализа белки в пробах плазмы крови, мочи или гомогенатах тканей органов осаждали равным объёмом пробы объёмом ацетонитрила. Полученные растворы встряхивали на шейкере в течение 2 мин, затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин (центрифуга Eppendorf MiniSpin, Eppendorf, США). Супернатант вводили в хроматограф. Разделение проводили на колонке Luna C18(2) размером $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм (Phenomenex, США) при температуре 30°C ; в качестве подвижной фазы использовали 5 мМ раствор натриевой соли пентансульфокислоты в смеси 10 мМ раствора фосфата калия монозамещенного (рН 7,0) и ацетонитрила (43:57 — для плазмы крови и 40:60 — для гомогенатов периферических тканей и мочи). Детектирование проводили при помощи флуориметра ABI 980 (ABI, США), длина волны возбуждения — 400 нм, длина волны испускания — 535 нм. Скорость подачи подвижной фазы составляла 1,2 мл/мин (плазма крови) и 1,0 мл/мин (гомогенаты периферических тканей и образцы мочи), объём пробы — 10 мкл.

Предел чувствительности обнаружения оливамида в биопробах составлял около 2 нг/мл, предел количественного определения — около 5 нг/мл.

Обработка результатов определения концентрации оливамида в биопробах. Статистический анализ результатов определения концентрации оливамида в биопробах предусматривал расчёт среднеарифметических (M_A) или среднегеометрических [$M_G = \exp(M_{A,ln})$] значений и их интервальной оценки,

вычисляемой как ($MA \pm SD$), где SD — стандартное отклонение, в случае среднеарифметического или [$\exp(M_{A,ln} \pm SD_{ln})$] — в случае среднегеометрического, где $M_{A,ln}$ и SD_{ln} , соответственно, среднеарифметическое и стандартное отклонение выборки после логарифмического преобразования её вариант. Расчёты проводили при помощи программы EXCEL 2010.

Анализ фармакокинетических данных. Индивидуальные профили изменения концентрации оливамида (C) в плазме крови кроликов и усреднённые профили, построенные по среднегеометрическим значениям его концентрации в плазме крови крыс, во времени (t) описывали трёхэкспоненциальным уравнением [2]:

$$C(t) = A_1 \exp(-\alpha t) + A_2 \exp(-\beta t) + A_3 (\exp(-\gamma t)), (1)$$

где A_1 , A_2 и A_3 — предэкспоненциальные множители, α , β и γ — комплексные параметры. Фармакокинетические профили характеризовали значениями общего клиренса (Cl_T), стационарного объёма распределения (V_{ss}) и среднего времени удержания в системном кровотоке (MRT), рассчитанными с помощью программы TOPFIT V. 1.1 (Gödecke, Schering, Thomae. 1991). Кроме того, при помощи той же программы вычисляли методом трапеций значения площади под фармакокинетической кривой в пределах от нуля до 24 ч (AUC_{24h}).

Усреднённые фармакокинетические профили оливамида в периферических тканях крыс характеризовали соответствующими значениями AUC_{24h} (AUC_{24h}^T). Тканевую доступность антибиотика (f_T) определяли по формуле [3]:

$$f_T (\%) = AUC_{24h}^T \times 100 / AUC_{24h} (2).$$

Результаты и обсуждение

Фармакокинетические профили оливамида в плазме крови крыс и кроликов показаны на рис. 1 и 2. Во всех случаях снижение уровней оливамида в плазме крови носило двухфазный характер. После резкого падения концентрации препарата в течение первых 15 мин (в 6 раз после его введения крысам в дозах 1 и 2 мг/кг и кроликам в дозе 0,4 мг/кг и в 20 раз после введения крысам в дозе 4 мг/кг) уровни оливамида снижались медленно вплоть до 24 ч. Эти особенности обусловлены быстрым перераспределением оливамида между кровью и периферическими тканями. Так, уже через 15 мин после введения уровни препарата в тканях мышц, сердца, лёгких, почек и селезёнки превышали соответству-

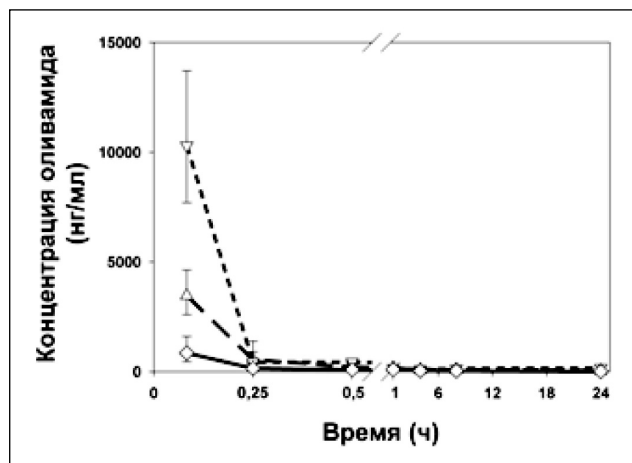


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили оливамида в плазме крови крыс после однократного введения в дозе 1 мг/кг — $\diamond$, 2 мг/кг — $\triangle$ и 4 мг/кг — ∇ .

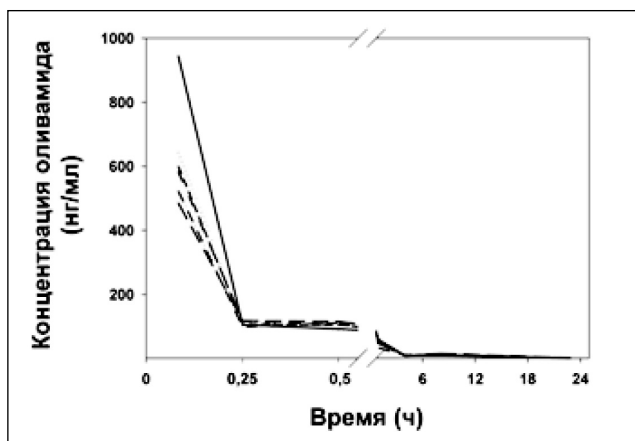


Рис. 2. Индивидуальные фармакокинетические профили оливамида в плазме крови кроликов после однократного введения в дозе 0,4 мг/кг.

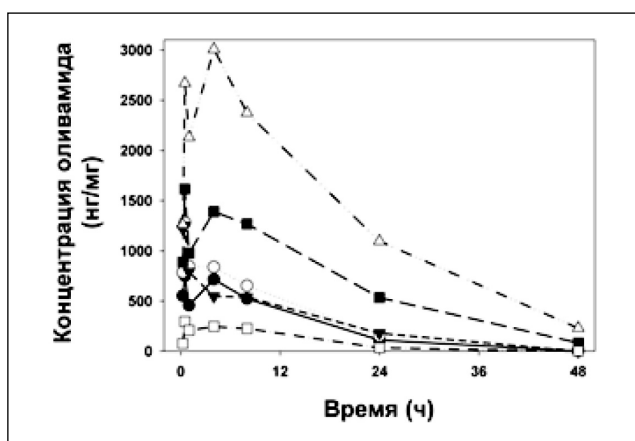


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические профили оливамида в периферических тканях крыс после введения в дозе 1 мг/кг: селезёнка — $\triangle$; лёгкие — $\blacksquare$; сердце — $\circ$; почки — $\blacktriangledown$; мышцы — $\bullet$; печень — $\square$.

ющую концентрацию в плазме крови в среднем, соответственно, в 4, 5, 6, 8 и 9 раз. В тот же момент времени лишь в тканях печени уровни оливамида были ниже, чем в крови. Как видно на рис. 3, последующее снижение концентрации препарата в периферических тканях происходит значительно медленнее, чем в крови. Например, через 24 ч после введения уровни оливамида в тканях селезёнки, лёгких, почек, сердца, мышц и печени были в 200, 100, 40, 30, 20 и 7 раз выше, чем в плазме крови, соответственно.

При этом даже через 48 ч после введения препарата, когда его уровни в плазме крови были ниже предела количественного обнаружения, концентрация препарата в тканях лёгких и селезёнки оставалась значительной: в среднем 80 и 230 нг/мг, соответственно. Значения тканевой доступности оливамида у крыс, составляли 5700%

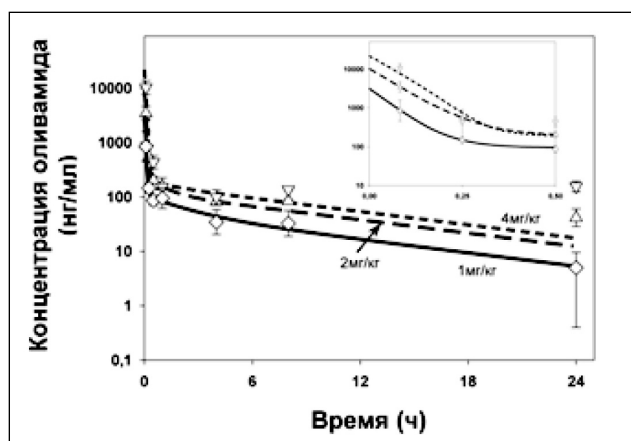


Рис. 4. Фармакокинетические профили оливамида в плазме крови крыс, описанные уравнением (1). Доза 1 мг/кг — $\diamond$; 2 мг/кг — $\triangle$; 4 мг/кг — ∇ . В правом верхнем углу — фрагменты кривых в пределах от 0 до 0,5 ч.

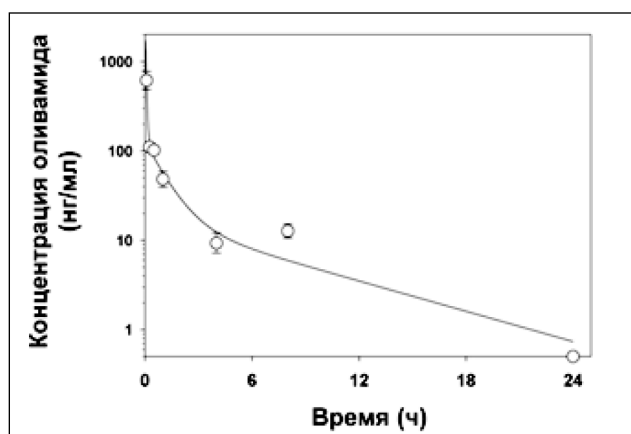


Рис. 5. Усреднённый фармакокинетический профиль оливамида в плазме крови кроликов, описанный уравнением (1).

(селезёнка), 2800% (лёгкие), 1500% (сердце), 1300% (почки) 1100% (мышцы) и 450% (печень).

Кумулятивная экскреция неизменённого оливамида с мочой крыс через 4 и 8 ч после инъекции, составляла, соответственно, 12 и 18% от дозы.

Параметры фармакокинетики оливамида у крыс и кроликов приведены в таблице. Как следует из представленных данных, значения общего клиренса (Cl_T) и стационарного объёма распределения (V_{ss}) у крыс оказались выше, чем у кроликов (17,9—22,0 против 16,2 мл $\times$ мин $^{-1}\times$ кг $^{-1}$ и 7,8—8,7 против 5,1 л/кг, соответственно). При этом, вопреки ожиданиям, среднее время удержания (MRT) оливамида у кроликов было меньше, чем у крыс (5,3 против 6,3—7,3 ч). Как у крыс, так и у кроликов фармакокинетические профили удовлетворительно описывались трёх-экспоненциальным уравнением (рис. 4, 5).

Параметры фармакокинетики оливамида у крыс и кроликов

Вид животного	Доза мг/кг	α ч-1	β ч-1	γ ч-1	Cl_T , мл/(мин×кг)	V_{ss} , л/кг	MRT , ч	$AUC_{24ч}$ нг×ч/мл
Крысы	1	0,04	1,51	7,37	20,0	8,7	7,3	859
	2	0,05	0,66	7,37	17,9	7,8	7,3	2380
	4	0,04	0,90	7,37	22,0	8,3	6,3	5200
Кролики	0,4	0,035	0,74	5,33	16,2	5,1	5,3	281

Величина $AUC_{24ч}$ возрастала пропорционально дозе — в 2,8 раз при повышении дозы оливамида от 1 до 2 мг/кг и в 2,2 раза при повышении дозы от 2 до 4 мг/кг. Зависимость $AUC_{24ч}$ от дозы описывалась уравнением прямой, проходящей через начало координат (рис. 6), что свидетельствует о линейности фармакокинетики препарата. О том же свидетельствует незначительная вариабельность значений Cl_T и V_{ss} , установленных при введении оливамида крысам в разных дозах (см. таблицу).

Проведённое фармакокинетическое изучение оливамида позволило установить интенсивное проникновение препарата в периферические ткани. Для оценки кумуляции оливамида при многократном введении необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Teyashova AN, Olsufyeva EN, Shtil AA, Dezhenkova LG, Isakova EB, Bukhman VM et al. Chemical modification of the antibiotic olivomycin A at the side chain of the aglycone moiety yields the derivative with perspective antitumor characteristics. *Bioorg & Med Chem* 2011; 19: 7387—7393.
2. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика (руководство). Медицина, М.: 1980. / Solov'ev V.N., Firsov A.A., Filov V.A. Farmakokinetika (rukovodstvo). Medicina, M.: 1980. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Портной Юрий Абрамович — с.н.с. лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «НИИНА», Москва

Довженко Светлана Анатольевна — к.х.н., с.н.с. лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «НИИНА», Москва

Кобрин Михаил Борисович — с.н.с. лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «НИИНА», Москва

Трещалин Михаил Иванович — н.с. лаборатории фармакологии ФГБНУ «НИИНА», Москва

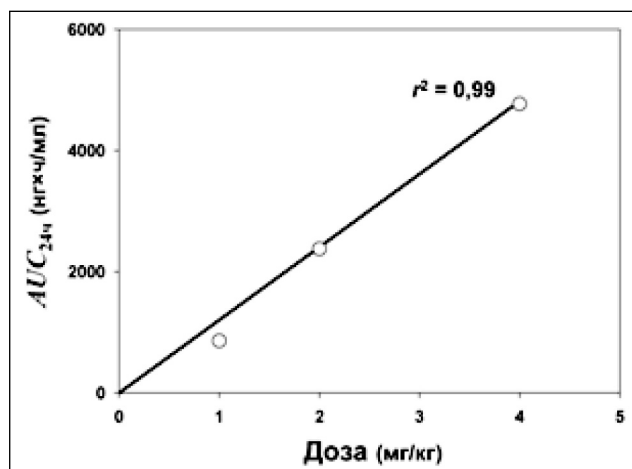


Рис. 6. Проверка гипотезы линейности фармакокинетики оливамида у крыс.

3. Фирсов А.А., Жердев В.П., Портной Ю.А., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Барманова Е.Ю. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств. В кн. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А. Н. Миронова. Изд. М.: Гриф и К. 2012; 845—855. / Firsov A.A., Zherdev V.P., Portnoj Ju.A., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Barmanova E.Ju. Metodicheskie rekomendacii po provedeniju doklinicheskikh issledovanij farmakokinetiki lekarstvennykh sredstv. V kn. «Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv» pod red. A. N. Mironova. Izd. M.: Grif i K. 2012; 845—855. [in Russian]

Голобродо Василиса Антоновна — к.б.н., н.с. лаборатории фармакологии ФГБНУ «НИИНА», Москва

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

Фирсов Александр Алексеевич — д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «НИИНА», Москва

Фармакоэпидемиологическое исследование использования антибактериальных средств в многопрофильных стационарах Санкт-Петербурга

С. В. СИДОРЕНКО^{1,2}, А. С. КОЛБИН^{3,4}, С. А. ШЛЯПНИКОВ^{2,5}, А. М. КУЖЕЛЬ⁶, А. В. РЕПИНА⁶, Ю. В. ЛОБЗИН^{1,2}, Н. Н. КЛИМКО², П. К. ЯБЛОНСКИЙ⁴, В. А. МАЗУРОВ², А. В. ЩЕГОЛЕВ⁷, А. В. РУДАКОВА¹, А. Р. ДАНИЛЬЧЕНКО⁶, Н. В. МУХИНА³, А. Я. МАЛИКОВ³, Ю. Е. БАЛЫКИНА⁴, А. А. МОСИКЯН³

¹ НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург

² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

⁵ НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург

⁶ Территориальный фонд обязательного медицинского страхования Санкт-Петербурга

⁷ Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Pharmacoepidemiological Study of the Use of Antibacterial Agents in the Multi-Specialty Hospitals of St. Petersburg

S. V. SIDORENKO^{1,2}, A. S. KOLBIN^{3,4}, S. A. SHLYAPNIKOV^{2,5}, A. M. KUZHEL⁶, A. V. REPINA⁶, YU. V. LOBZIN^{1,2}, N. N. KLIMKO², P. K. YABLONSKY⁴, V. A. MAZUROV², A. V. SHCHEGOLEV⁷, A. V. RUDAKOVA¹, A. R. DANILCHENKO⁶, N. V. MUKHINA³, A. YA. MALIKOV³, YU. E. BALYKINA⁴, A. A. MOSIKYAN³

¹ Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

² North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg

³ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg

⁴ Saint Petersburg University, St. Petersburg

⁵ St. Petersburg I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg

⁶ Territorial fund of compulsory medical insurance of St. Petersburg, St. Petersburg

⁷ S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg

По инициативе Территориального фонда обязательного медицинского страхования (ТФОМС) Санкт-Петербурга в течение 2014 г. в четырёх многопрофильных стационарах города (с общим коечным фондом более 4 тыс) было инициировано ретроспективное кросс-секционное обсервационное исследование структуры и адекватности применения антибиотиков. Всего было проанализировано 18250 медицинских карт стационарного больного, из которых было отобрано 2008 карт пациентов, получавших антибиотики, по отобранным картам были заполнены ИРК. В дальнейшем из 2008 ИРК, после окончательной проверки электронной базы, были оставлены 1978 ИРК, которые и были включены в подробный анализ. Из 1978 случаев назначения антибиотиков микробиологическое исследование было проведено в 585 (28%). Каждый пациент получил в среднем 1,9 курсов антибиотиков. В основном длительность составляла до двух недель. В 51% случаев были назначены короткие курсы (от 1 до 5 дней), в 40% случаев длительность терапии колебалась от 6 до 14 дней. Лишь 9% приходилось на приём антибиотиков более 2 недель. Всего было использовано 60 различных антибиотиков. На цефтриаксон, метронидазол, ципрофлоксацин, цефазолин и цефотаксим приходится 78% назначений. Чаще всего использовали комбинированную терапию из 2 антибактериальных препаратов. На периоперационную профилактику в хирургии приходилось 22% назначений, в 67% случаев антибиотики назначали с целью эмпирической терапии. Направленная терапия составляла лишь 7% от общего числа назначений. Только в 14% случаев длительность первичной антибиотикопрофилактики в хирургии составляла до 24 ч. При остром пиелонефрите адекватная антибактериальная терапия была назначена в 26% случаев, при внебольничной пневмонии — в 31%. В 35% случаев антибиотики были назначены при отсутствии документированных в истории болезни признаков бактериальной инфекции. Очевидна настоятельная необходимость принятия срочных мер по оптимизации практики антибактериальной терапии в стационарах Санкт-Петербурга.

Ключевые слова: фармакоэпидемиология, антибактериальные средства, многопрофильные стационары.

At the initiative of the St. Petersburg's Territorial Fund for Mandatory Medical Insurance a retrospective cross-sectional observational study of the structure and adequacy of antibiotic use was initiated in four multi-specialty hospitals in the city (with a total bed capacity of more than 4 thousand) in 2014. In total, 18,250 medical records of the inpatients were analyzed,

© Коллектив авторов, 2017

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

of which 2008 cards of the patients receiving antibiotics were selected, the CRFs were filled in according to the selected cards. Subsequently, 1978 of the 2008 CRFs were included in the detailed analysis after the final verification of the electronic database. Of the 1978 antibiotic prescriptions, a microbiological study was assigned in 585 (28%). Each patient received an average of 1.9 courses of antibiotics. In general, the therapy duration was up to two weeks. Short courses (from 1 to 5 days) were prescribed in 51% of cases, in 40% of cases the duration of therapy ranged from 6 to 14 days. Only 9% had to take antibiotics for more than 2 weeks. A total of 60 different antibiotics were used. Ceftriaxone, metronidazole, ciprofloxacin, cefazolin, and cefotaxime accounted for 78% of prescriptions. The most commonly prescribed combination therapy used 2 antibacterial drugs. Perioperative prophylaxis in surgery accounted for 22% of prescriptions, antibiotics were prescribed for the purpose of empirical therapy in 67% of cases. Targeted therapy accounted for only 7% of the total number of medical prescriptions. The duration of primary antibiotic prophylaxis in surgery was up to 24 hours only in 14% of the cases. Adequate antibiotic therapy was prescribed in 26% of the cases of acute pyelonephritis and in 31% of the cases of community-acquired pneumonia. Antibiotics were prescribed in the absence of the signs of bacterial infection documented in the medical history in 35% of the cases. There is an obvious need to take urgent measures to optimize the practice of antibiotic therapy in hospitals of St. Petersburg.

Keywords: *pharmacoepidemiology, antibacterial agents, multi-specialty hospitals.*

Введение

Несмотря на значительные достижения в области разработки и внедрения антибактериальных препаратов и противoinфекционной терапии в целом, инфекционные заболевания остаются значимыми причинами заболеваемости и смертности во всем мире [1–4]. К одной из причин таких неудовлетворительных исходов относят приобретённую бактериальную резистентность. Распространение этого явления уже давно осознано мировым сообществом как реальная угроза системе здравоохранения, что нашло отражение в принятии Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, 2001) «Глобальной стратегии по сдерживанию антимикробной резистентности» [5]. Формирование и распространение среди возбудителей инфекционных болезней человека устойчивости к антибиотикам приводит к резкому снижению эффективности лечения, значительным экономическим и социальным потерям.

В Российской Федерации актуальность проблемы резистентности находит понимание на государственном уровне. Так, 22 ноября 2012 года в г. Москве состоялось заседание Экспертного Совета по здравоохранению при Комитете Совета Федерации по социальной политике на тему «Антимикробная резистентность как угроза здоровью населения Российской Федерации». По результатам обсуждения органам исполнительной власти субъектов Российской Федерации рекомендовано разработать комплекс мероприятий по профилактике антимикробной резистентности, включая разработку целевых программ субъектов РФ [6].

Среди причин, приводящих к формированию и распространению антимикробной резистентности, важнейшую роль играет необоснованное и избыточное назначение АБ. По экспертным оценкам в стационарных условиях до 20–30% назначений антибиотиков могут быть необоснованными. Нерациональное назначение АБ ложится тяжёлым бременем на систему обязательного медицинского страхования.

Для разработки эффективных мероприятий, направленных на оптимизацию потребления АБ, необходимы реальные исходные данные, характеризующие состояние проблемы. В связи с этим в Санкт-Петербурге было инициировано настоящее исследование, задачами которого были:

- анализ эффективности сложившейся практики микробиологической диагностики инфекций;
- оценка существующей практики антибактериальной терапии основных нозологических форм.

Материал и методы

Территориальным фондом обязательного медицинского страхования (ТФОМС) Санкт-Петербурга в 4 многопрофильных стационарах города (с общим коечным фондом более 4 тыс) было инициировано ретроспективное кросс-секционное обсервационное исследование структуры и адекватности применения антибиотиков.

Этапы исследования

1-й этап. Разработка протокола исследований и индивидуальной регистрационной карты. Протокол исследования был разработан на основе рекомендации GCP (Good Clinical Practice, Надлежащая клиническая практика). Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией последнего пересмотра (2013 г.), правилами Надлежащей клинической и эпидемиологической практик, другими применяемыми в Российской Федерации нормативными документами. Индивидуальная регистрационная карта (ИРК) включала 91 показатель (демографические данные, результаты микробиологических исследований, характеристика режимов антибактериальной терапии). Данные вносили в закодированном виде, не позволяющем установить личность пациента. На проведение исследования было получено одобрение независимого Этического комитета. Проверку качества осуществлял сотрудник, ответственный за контроль качества, путём выборочной проверки каждой 25-й истории болезни. Таким образом, был предусмотрен 5% план сверки первичной документации. Также была проверена документация каждого 100-го пациента, просмотренно-го рецензентами, но не подошедшего для исследования.

2 этап. Оценка объёма потребления антибиотиков в каждом учреждении. Оценку проводили на основании данных аптек учреждений, включённых в исследование. Применяли методику Activity Based Costing — метод оценки рациональности использования ресурсов по трём группам в соответствии с их фактическим потреблением за определённый период времени.

3 этап. Анализ историй болезни и заполнение индивидуальных регистрационных карт. Специально обученные рейтеры провели сплошное изучение историй болезни пациентов, находившихся на лечении в четырёх медицинских учреждениях СПб в 2014 г. В ходе изучения были отобраны истории болезни пациентов, получавших антибактериальные препараты. Данные из отобранных историй болезни вносили в ИРК. Исследователи взяли на себя обязанность неразглашения личных и медицинских данных пациентов.

4 этап. Ввод ИРК в единую базу. Внесение информации в базу из ИРК производили независимые операторы. Контроль качества осуществлял сотрудник, ответственный за контроль качества, путём выборочной проверки каждой 25-й истории болезни. Таким образом, был предусмотрен 5% план сверки первичной документации. Также была проверена документация каждого 100-го пациента, просмотренного рейтерами, но не подошедшего для исследования.

5 этап. Анализ результатов.

Результаты исследования

Общая характеристика пациентов. Всего было проанализировано 18250 медицинских карт стационарного больного, из которых было отобрано 2008 карт пациентов, получавших антибиотики, по отобранным картам были заполнены ИРК. В дальнейшем из 2008 ИРК, после окончательной проверки электронной базы, были оставлены 1978 ИРК, которые и включены в подробный анализ. Число мужчин и женщин составляло 49 и 51%, соответственно. На пациентов в возрасте от 26 до 70 лет приходилось 86% госпитализаций. При этом 13% госпитализированных находилось в возрастной группе до 25 лет.

Продолжительность госпитализации в большинстве случаев составляла 8–9 дней (диапазон от 4 до 75 дней). Были проанализированы шесть различных вариантов клинических исходов: (1) выздоровление; (2) улучшение; (3) без изменений; (4) осложнение; (5) смерть; (6) перевод в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). В процентном соотношении в 77% случаев было зафиксировано улучшение состояния, в 19% случаев фиксировали выздоровление.

Микробиологическое обоснование антибактериальной терапии. Анализ ИРК показал, что из 1978 случаев назначения антибиотиков микробиологическое исследование было назначено в 585 (28%). Исследовали кровь, мочу, мокроту, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), спинномозговую жидкость, раневое отделяемое и другие биоматериалы. В подавляющем большинстве случаев у отдельных пациентов было проведено лишь одно исследование (529 случаев, 90%), два исследования были назначены в 56 случаях. Чаще всего (21%) источником биоматериала служило раневое отделяемое. Из исследованных 585 образцов биоматериалов в 285 случаях констатировали «отсутствие роста», в 300 посевах выявили рост того или иного микроорганизма. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из представленных данных, чаще всего выявляли *Escherichia coli* (29%, в основном

Таблица 1. Результаты микробиологического исследования биоматериалов у пациентов, получавших антибиотики

Вид микроорганизма	% от общего количества (n=300)
<i>Escherichia coli</i>	29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11
<i>Serratia marcescens</i>	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	5
<i>Enterococcus faecium</i>	5
<i>Proteus vulgaris</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	1

Таблица 2. Количество назначений антибактериальных препаратов

Антибиотик	Количество назначений	
	абс. (n=3736)	% (100)
Цефтриаксон	1062	28
Метронидазол	581	16
Ципрофлоксацин	535	14
Цефазолин	458	12
Цефотаксим	387	10
Амикацин	288	8
Гентамицин	113	3
Ампициллин/сульбактам	75	2
Амоксициллин/клавуланат	42	1
Другие	195	6

из мочи), далее — *Klebsiella pneumoniae* (18%), *Pseudomonas aeruginosa* (14%).

Характеристика антибактериальной терапии.

При анализе данных под курсом антибактериальной терапии понимали применение отдельного препарата в течение суток и более. Всего 1978 пациентов, включённых в исследование, получили 3736 курсов антибактериальной терапии, таким образом, каждый пациент получил в среднем 1,9 курсов антибиотиков. В основном длительность составляла до двух недель. В 51% случаев были назначены короткие курсы (от 1 до 5 дней), в 40% случаев длительность терапии колебалась от 6 до 14 дней. И лишь 9% больных получали лечение антибиотиками более 2 недель. Всего было использовано 60 различных антибиотиков. Наиболее часто назначаемые антибиотики представлены в табл. 2.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, на цефтриаксон, метронидазол, ципрофлоксацин, цефазолин и цефотаксим приходилось 78% назначений. Чаще всего использовали комбинированную терапию из 2 антибактериальных препаратов, комбинацию из 3 и более АБ применяли реже.

При назначении антибактериальной терапии преследовали следующие цели: проведение периоперационной профилактики в хирургии, проведение эмпирической терапии, клинически выраженной или предполагаемой инфекции, проведение целенаправленной терапии в отношении вы-

деленного возбудителя с установленной антибиоточувствительностью. В ряде случаев при анализе медицинских карт цели назначения антибиотиков установить не удалось. Распределение назначений представлено в табл. 3.

Как видно из представленных в табл. 3 данных на периоперационную профилактику в хирургии приходилось 22% назначений, в 67% случаев антибиотики назначали с целью эмпирической терапии. Направленная терапия составляла лишь 7% от общего числа назначений.

Эмпирическая антибиотикотерапия. Согласно рекомендациям [8], продолжение антибактериальной терапии более 7 сут должно быть обосновано и документировано в истории болезни. При анализе полученных данных выявлено, что эмпирическую терапию длительностью до 7 сут применяли в 76%. В остальных случаях медиана назначений была 10 дней (от 8 до 46 дней). Обоснования назначения длительных курсов в историях болезни не обнаружено.

Для анализа адекватности и целесообразности терапии все назначения были разделены в зависимости от «предполагаемого обобщающего клинического диагноза», который зачастую можно было трактовать как «показание к эмпирической терапии». Перечень диагнозов, при которых назначали эмпирическую терапию, оказался достаточно широким. Наиболее часто встречавшиеся «диагнозы» ($n=1141$ из 2502 случаев назначения эмпирической терапии) представлены в табл. 4.

Таблица 3. Количество назначений антибактериальных препаратов

Цель введения	Количество назначений	
	абс. ($n=3794$)	% (100)
Эмпирическая терапия	2502	67
Периоперационная профилактика в хирургии	848	22
Направленная этиотропная терапия	264	7
Неизвестно	180	4

Как видно из представленных в табл. 4 данных, наиболее часто (более чем в 70% случаев) антибиотики в качестве эмпирической терапии назначали при внебольничной пневмонии, пиелонефрите, синусите, панкреатите, цистите, бронхите, ХОБЛ и абсцессе. При этом в 35% случаев анализ истории болезни не позволил выявить у пациентов, получавших антибиотики, признаки инфекции.

Оценка адекватности назначения антибиотиков

Адекватность назначения антибиотиков оценивалась экспертами на основании национальных рекомендаций. Представлена оценка адекватности периоперационной профилактики в хирургии и эмпирической терапии для двух наиболее часто встречающихся нозологических форм бактериальных инфекций: острого пиелонефрита и внебольничной пневмонии.

Периоперационная антибиотикопрофилактика в хирургии. Согласно существующим рекомендациям, в большинстве случаев, оптимальным ре-

Таблица 4. Наиболее часто применяемые антибиотики при основных обобщённых клинических диагнозах

Диагноз	Количество назначений эмпирической терапии, $n=1141$ (%)	Наиболее часто применяемые антибиотики (>40%)
Операция/послеоперационное состояние*	174 (15)	Комбинация метронидазол + бета-лактамы антибиотик
Острый пиелонефрит	163 (14)	Монотерапия цефазолином
Внебольничная пневмония	110 (9)	Комбинация цефотаксим + ципрофлоксацин
Мочекаменная болезнь	107 (9)	Монотерапия цефтриаксоном
Желчекаменная болезнь/холецистит	68 (6)	Монотерапия цефтриаксоном
Панкреатит	66 (6)	Монотерапия цефазолином
Синусит/гайморит	63 (5)	Монотерапия цефтриаксоном
Злокачественное новообразование*	49 (4)	Монотерапия цефотаксим
Беременность/выкидыш/роды*	37 (3)	Комбинация гентамицин + цефтриаксон
Доброкачественная опухоль*	34 (3)	Монотерапия цефтриаксоном
Открытая черепно-мозговая травма/закрытая черепно-мозговая травма*	33 (3)	Монотерапия цефазолин
Аденома*	31 (3)	Монотерапия цефтриаксоном
Цистит	30 (3)	Монотерапия ципрофлоксацин
Бронхит	30 (3)	Монотерапия цефтриаксоном
Хроническая обструктивная болезнь лёгких	27 (2)	Монотерапия цефотаксимом.
Язвенная болезнь	25 (2)	Комбинация метронидазол + бета-лактамы антибиотик
Абсцессы	25 (2)	Комбинация метронидазол + бета-лактамы антибиотик
Травма*	21 (2)	Монотерапия цефтриаксоном
Нефрит	19 (1)	Монотерапия цефтриаксоном
Тромбоз/тромбоэмболия/тромбофлебит/варикоз*	15 (1)	Монотерапия цефтриаксоном
Грыжа*	14 (1)	Монотерапия цефотаксимом

Примечание. * – При анализе историй болезни документированных признаков инфекции выявлено не было.

Таблица 5. Эмпирическая антибиотикотерапия острого пиелонефрита (163 случая)

Режим лечения	Количество (%) назначений	Экспертная оценка	Рекомендуемая терапия [9, 10]
Монотерапия	99 (70,7)		
цефазолин	51 (31,3)	Неадекватная	Монотерапия
цефтриаксон	26 (16,0)	Адекватная	фторхинолонами,
ципрофлоксацин	15 (9,2)	Адекватная	цефалоспорины III,
другие режимы монотерапии	7 (4,3)	Адекватная	защищёнными
Комбинации из 2 антибиотиков	36 (33,1)		пенициллинами
метронидазол + цiproфлоксацин	23 (14,1)	Избыточная	в зависимости
цефтриаксон + цiproфлоксацин	8 (4,9)		от чувствительности
цефтриаксон + амикацин	5 (3,1)		
другие комбинации 2 антибиотиков	18 (11,0)		
Комбинация трёх и более антибиотиков	10 (6,1)		

Таблица 6. Эмпирическая антибиотикотерапия внебольничной пневмонии (110 случаев)

Режим лечения	Количество (%) назначений	Экспертная оценка	Рекомендуемая терапия [11]
Монотерапия	29 (26,4)		Для пациентов,
цефотаксим	10 (9,1)	Адекватное	госпитализированных
цефтриаксон	6 (5,5)	Адекватное	в отделения общего профиля:
цефазолин	6 (5,5)	Неадекватное	респираторные фторхинолоны,
другие режимы монотерапии	7 (6,4)	Неадекватное	цефотаксим, цефтриаксон,
Комбинации из 2-х антибиотиков	43 (39,1)		ампициллин, эртапенем,
цефотаксим/цефтриаксон+ципрофлоксацин	24 (21,8)	Избыточное	макролиды.
цефтриаксон+амикацин	8 (7,3)	Избыточное	
другие комбинации 2 антибиотиков	11 (10)	Избыточное	
Комбинированная трёх и более антибиотиков	25 (22,7%)	Избыточное	

жимом периоперационной профилактики является однократное введение антибиотика, и лишь в редких случаях его длительность может превышать 24 ч [7]. При анализе полученных данных выявлено, что длительность периоперационной профилактики составляла сутки и менее лишь в 14% случаев ($n=121$); 2 дня — в 9% ($n=83$); 3 дня — в 11% ($n=94$). В остальных случаях длительность периоперационной профилактики колебалась от 4 до 11 дней. С целью профилактики наиболее часто назначают цефтриаксон (29%), цефазолин (22%) и метронидазол (15%).

Острый пиелонефрит. Данные о частоте назначения различных режимов антибактериальной терапии острого пиелонефрита и об экспертной оценке их адекватности представлены в табл. 5. Адекватная антибактериальная терапия пиелонефрита должна быть основана на бактериологическом исследовании мочи, однако это исследование было назначено лишь в 42% случаев. Как следует из представленных данных, чаще всего для лечения острого пиелонефрита назначали цефазолин — в 31,3% случаев. В действующей инструкции по применению цефазолина (<http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>) в перечне показаний приведены инфекции мочевыводящих путей, однако согласно рекомендациям Европейской ассоциации по урологии (European Association of Urology) и основанным на них Российских национальных рекомендациях, цефалоспорины I–II поколений не рассматриваются как адекватные средства лечения пиелонефрита. Адекватная антибактериальная терапия (цефалоспорины III поколения, защищённые пени-

циллины или фторхинолоны) при остром пиелонефрите была назначена в 29,5% случаев. Поскольку режимы комбинированной терапии, как правило, включали один из рекомендованных антибиотиков (цефалоспорин III поколения или фторхинолон), их не рассматривали как полностью неадекватные, а относили к избыточным.

Внебольничная пневмония. Данные о частоте назначения различных режимов антибактериальной терапии внебольничной пневмонии и об экспертной оценке их адекватности представлены в табл. 6. Из 110 случаев пневмонии монотерапия была назначена в 29 (26,4%) случаях. Как адекватное было расценено назначение цефотаксима и цефтриаксона, цефазолина — как неадекватное. Комбинированную терапию двумя препаратами назначали чаще — в 39% случаев. В большинстве случаев это была комбинация цефотаксима или цефтриаксона с цiproфлоксацином, что было расценено как избыточное назначение. Другой частой избыточной комбинацией было назначение амикацина с цефтриаксоном.

Обсуждение результатов

Оценивая сложившуюся практику применения антибиотиков в стационарах Санкт-Петербурга, в первую очередь, следует отметить недостаточный уровень микробиологической диагностики инфекций в ведущих медицинских учреждениях. Так, материал из предполагаемых очагов инфекции был направлен на исследование лишь у 28% пациентов, получивших антибиотики, а этиология инфекции была установлена только в

15,2% случаев. Целенаправленная терапия, основанная на результатах микробиологического исследования, была назначена лишь в 7% случаев.

Наиболее распространённой практикой антибактериальной терапии оказалось назначение нескольких антибиотиков, на одного пациента в среднем приходилось назначение 1,9 курсов антибактериальных препаратов. На цефтриаксон, метронидазол, цiproфлоксацин, цефазолин и цефотаксим приходится 78% назначений.

Среди показаний для назначения антибиотиков основной была периоперационная профилактика в хирургии (в 22% от всех случаев назначения антибиотиков). При этом только в 14% длительность первичной антибиотикопрофилактики в хирургии составила до 24 ч. Ещё в 9% случаев длительность профилактики составляла 48 ч, что принято при кардиохирургических оперативных вмешательствах с искусственным кровообращением. Таким образом, в 77% длительность профилактики в хирургии была явно избыточной. Цефазолин, рассматриваемый как стандарт при профилактике, применяли только в 22% случаев. В 40% случаев для профилактики применяли цефтриаксон или цефотаксим, в 15% — метронидазол и в 6% — амикацин. Все перечисленные режимы периоперационной профилактики нельзя рассматривать как оптимальные.

При оценке показаний для назначения антибиотиков оказалось, что в 35% случаев антибиотиков были назначены при отсутствии документированных в истории болезни признаков бактериальной инфекции.

При сопоставлении клинического диагноза и вида антибиотикотерапии было установлено, что для таких диагнозов, как пиелонефрит, внебольничная пневмония, синусит, панкреатит, цистит, бронхит, ХОБЛ и абсцесс более чем в

70% случаев она носила эмпирический характер. В приведённых примерах рациональности эмпирической антибиотикотерапии инфекции мочевыводящих путей и внебольничной пневмонии показано, что соответственно в 74 и в 69% случаев клиническая практика не соответствовала национальным рекомендациям.

Сопоставление сложившейся практики антибактериальной терапии и уровня антибиотикорезистентности микроорганизмов выявило определённые противоречия. Так, для эмпирической терапии чаще всего назначали цефтриаксон (28%), метронидазол (16%), цiproфлоксацин (14%), цефазолин (12%) и цефотаксим (10%), при том, что уровень устойчивости к этим антибиотикам среди всех групп бактерий превышает в Санкт-Петербурге 70% [12].

В целом следует признать, что сложившаяся в ведущих стационарах Санкт-Петербурга практика антибактериальной терапии далека от рациональной. На фоне низкого уровня микробиологической диагностики широко распространено необоснованное и неадекватное назначение антибиотиков, что является важнейшим фактором, способствующим формированию и распространению антимикробной резистентности.

Таким образом, настоятельная необходимость принятия срочных мер по оптимизации практики антибактериальной терапии в стационарах Санкт-Петербурга очевидна. Реальное воздействие на обоснованность назначения антибиотиков возможно при внедрении в медицинских учреждениях стратегии контроля антибактериальной терапии (Antimicrobial stewardship), в частности целенаправленное внедрение новых Российских рекомендаций «Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии)» при оказании стационарной медицинской помощи.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Spellberg B., Guidos R., Gilbert D. et al.* The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46 (2): 155–164.
2. *Macgowan A.P.; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance.* Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: Suppl 2: ii105–114.
3. *Schwaber M.J., Carmeli Y.* Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60 (5): 913–920.
4. *Whitby M., McLaws M.L., Berry G.* Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med J Aust* 2001; 175 (5): 264–267.
5. World Health Organization. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/20012 2001.
6. www.zdrav.ru
7. Приложение 1 к распоряжению Комитета по здравоохранению от 15. 06. 2012 №274-р. Правительство Санкт-Петербурга Комитет по здравоохранению. Стандарт административно-территориальный. Протокол ведения больных. Периоперационная антимикробная профилактика инфекций в области хирургического вмешательства. / *Prilozhenie 1 k rasporjazheniju Komiteta po zdравоохранeniju ot 15. 06. 2012 №274-r. Pravitel'stvo Sankt-Peterburga Komitet po*
8. *Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России. Российские национальные рекомендации.* Под ред. В. С. Савельева, Б. Р. Гельфанда, С. В. Яковлева. М.: 2012. / *Strategija i taktika primenenija antimikrobnых sredstv v lechebnых uchrezhdenijakh Rossii. Rossijskie nacional'nye rekomendacii.* Pod red. V. S. Savel'eva, B. R. Gel'fanda, S. V. Jakovleva. M.: 2012. [in Russian]
9. Guidelines of European Association of Urology 2015 <http://www.uroweb.org/professional-resources/guidelines>
10. Рекомендации по ведению больных с инфекциями почек, мочевых путей и мужских половых органов - EAU. Европейской урологической ассоциация EAU. 2007 / *Guidelines of European Association of Urology 2015* <http://www.uroweb.org/professional-resources/guidelines> [in Russian]
11. *Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А.* Внебольничная пневмония у взрослых. Практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М.: 2010; 106. / *Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S., Tjurin I.E., Rachina S.A.* Vnebol'nichnaja pnevmonija u vzroslykh. Prakticheskie rekomendacii po diagnostike, lecheniju i profilaktike. M.: 2010; 106. [in Russian]
12. *Partina I., Kalinogorskaya O., Kojima S., Gostev V., Volkova M., Ageevets V., Lobzin Y., Sidorenko S.* Surveillance of antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae pathogens isolated from intensive care units and surgical units in Russia. *Jpn J Antibiot* 2016; 69 (1): 41–51.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сидоренко Сергей Владимирович — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры медицинской микробиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Колбин Алексей Сергеевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и доказательной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова; профессор кафедры фармакологии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Климко Николай Николаевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, Санкт-Петербург

Яблонский Петр Каземирович — д. м. н., профессор, Директор Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ; Декан медицинского факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета, Заведующий кафедрой госпитальной хирургии медицинского факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург

Мазуров Владимир Иванович — д. м. н., профессор, академик РАМН, заведующий кафедрой терапии и ревматологии им. Э. Э. Эйхвальда; главный научный консультант ректора федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Рудакова Алла Васильевна — д. м. н., профессор, старший научный сотрудник отдела организации медицинской помощи Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Мухина Надежда Васильевна — ассистент кафедры клинической фармакологии и доказательной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

Маликов Алексей Яковлевич — Заведующий отделом интеллектуальной собственности и трансфера технологий, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

Балыкина Юлия Ефимовна — к. физ.-мат. н., доцент факультета прикладной математики — процессов управления Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Мосикян Анна Альбертовна — ординатор Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

Видовой состав уропатогенов и диапазон чувствительности к антибиотикам основных возбудителей, выделенных из мочи больных с мочекаменной болезнью

Е. И. ВАСИЛЬЕВА, В. И. СОКОЛОВА, Д. А. СЫЧЕВ, М. Б. БАБАРИНА

Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва

Российская медицинская академия непрерывного последилового образования, Москва

Species Composition of Uropathogens and Sensitivity Range to Antibiotics of the Main Pathogens Isolated from the Urine of Patients with Urolithiasis

E. I. VASILYEVA, V. I. SOKOLOVA, D. A. SYCHEV, M. B. BABARINA

Scientific Clinical Center of JSC «Russian Railways», Moscow

Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

За период с 2010 по 2015 гг. обследовано 4324 больных с основным диагнозом — мочекаменная болезнь. Выделено 2372 штамма, лидирующими уропатогенами были бактерии рода *Enterococcus* и *Escherichia coli*. Отмечена высокая активность фосфомицина в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных культур, что позволяет рекомендовать данный препарат в качестве профилактики, в частности при эндоскопических процедурах. Фторхинолоны, из-за высокой резистентности к ним большинства уропатогенов (29% и выше), а также возможной селекции полирезистентных возбудителей, не рекомендуются назначать рутинно и следует применять при наличии подтвержденной чувствительности к ним, а также при подозрении на наличие инфекции верхних мочевыводящих путей.

Ключевые слова: урологические больные, антибактериальная терапия, фосфомицин, фторхинолоны.

4324 patients with a basic diagnosis of urolithiasis were examined from 2010 to 2015. 2372 strains were isolated, the leading uropathogens were the bacteria of the genus *Enterococcus* and *Escherichia coli*. The high activity of phosphomycin against both gram-positive and gram-negative cultures was noted, which makes it possible to recommend this drug as prophylaxis, in particular for endoscopic procedures. Because of the high resistance of most uropathogens (29% and more), as well as the possible selection of multiresistant pathogens, fluoroquinolones should not be routinely prescribed and should be used in the presence of confirmed sensitivity to them, as well as for suspected infections of the upper urinary tract.

Keywords: patients with urological disorders, antibacterial therapy, phosphomycin, fluoroquinolones.

Введение

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к числу наиболее распространенных заболеваний как в амбулаторной, так и в клинической практике [1–3].

По локализации ИМП подразделяются на инфекции верхних (различные формы пиелонефрита) и нижних (цистит, уретрит, простатит) мочевыводящих путей, по характеру течения — на осложненные и неосложненные. Неосложненные ИМП возникают у больных при отсутствии obstructивных уропатий и стриктурных изменений в почках и мочевыводящих путях, а также у больных без сопутствующих заболеваний [4]. Осложненные ИМП возникают на фоне имеющихся предрасполагающих факторов, таких как мочекаменная болезнь, стриктура уретры, гипертрофия

простаты и др., а также вследствие лечебных манипуляций (катетеризация) или механического повреждения (травмы), при этом существенное значение имеют сопутствующие заболевания, такие как сахарный диабет, нейропатия, иммунодефицитные состояния и др. [5–7]. Иногда ИМП протекают с выраженной клинической симптоматикой и сопровождаются бактериемией или уросепсисом [7–9]. Кроме того, осложненные инфекции характеризуются рецидивирующим течением и плохо поддаются лечению антибактериальными препаратами [9, 10], в связи с чем важным является разделение осложненных и неосложненных ИМП, которые характеризуются существенными различиями по этиологии, клиническому течению и соответственно различными подходами к их лечению [10–18].

По распространенности ИМП уступают только инфекциям дыхательных путей, при этом они чаще развиваются у женщин. Однако у определенной категории пациентов ИМП являются

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 123567, Москва, Волоколамское ш., 84. НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД»

лидирующими и могут приводить к развитию осложнений, которые имеют тенденцию к рецидивированию. Одной из таких групп риска являются пациенты с сахарным диабетом и мочекаменной болезнью (МКБ). Нарушение уродинамики создаёт условия для развития воспалительного инфекционного процесса мочевыводящих путей и репродуктивной системы как у мужчин, так и у женщин. Бактериологическое исследование (посев) мочи позволяет идентифицировать микрофлору мочи, определить титр (количество) бактерий и чувствительность микрофлоры к антибактериальным препаратам. Результаты этих исследований позволяют проводить этиотропное лечение, в частности пиелонефрита, являющегося одной из причин рецидивов камнеобразования. Важным аспектом ведения больных нефролитиазом является правильный подбор медикаментозной экспульсивной (литокинетической) терапии, в том числе в сочетании с антибактериальной в случае наличия инфекции. По рекомендациям Европейской ассоциации урологов (European Association of Urology, 2001 г.) [2, 3] при выборе препарата первой линии лечения следует отдавать предпочтение, помимо нестероидных противовоспалительных средств, антимикробным препаратам, в частности фторхинолонам и фосфомицину трометамолу (оригинальный препарат Монурал). В Федеральных рекомендациях «Антимикробная терапия и профилактика инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов» [10] были внесены изменения, основанные на результатах последнего российского эпидемиологического исследова-

ния «Дармис» 2012 [16], согласно которым цефалоспорины III поколения удалены из рекомендаций по лечению рецидивирующего цистита, а фторхинолоны, к которым был отмечен рост резистентности уропатогенов (19,2%), были перенесены из группы основных препаратов в альтернативные; причём в ряду фторхинолонов норфлоксацин удалён из рекомендаций.

Цель исследования — изучить спектр возбудителей мочевого инфекционного заболевания у больных с мочекаменной болезнью и диапазон чувствительности выделенных из мочи микроорганизмов к различным фторхинолонам и фосфомицину.

Материал и методы

За период с 2010 по 2015 гг. обследовано 4324 больных урологического отделения НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД» с основным диагнозом — мочекаменная болезнь. Выделено 2372 штамма уропатогенов, что подтвердило инфекционную природу воспаления в 41% случаев.

Первичный посев мочи выполняли по Вуду петлей диаметром 2 мм на поверхность мясо-пептонного агара. Параллельно с этим проводили посев на кровяной агар и селективные среды (агар Эндо, желточно-солевой, Сабуро и др.). Степень бактериурии определяли по таблице Рябинского—Родмана. Идентификацию изолятов проводили с помощью коммерческих тест-систем Erba Lachema (Чехия) и bioMérieux (Франция). Оценку чувствительности выделенных штаммов к фторхинолонам и фосфомицину проводили диско-диффузионным методом на агаре Mueller–Hinton.

Результаты исследования

Изучена микрофлора, выделенная из мочи больных с мочекаменной болезнью. Всего было идентифицировано 2372 штамма микроорганизмов (табл. 1).

Таблица 1. Спектр выделенных уропатогенов

Микроорганизмы	Всего	%
<i>Enterococcus (faecalis, faecium, sp.)</i>	624	26
<i>Escherichia coli</i>	533	22
<i>Staphylococcus (haemolyticus, epidermidis)</i>	381	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	1
<i>Klebsiella (pneumoniae, oxytoca, ornithinolytica)</i>	142	6
<i>Enterobacter (aerogenes, cloacae, sp.)</i>	129	5
<i>Streptococcus (agalactiae, mitis, oralis, anginosus, pneumoniae, sanguis)</i>	106	5
<i>Proteus (mirabilis, vulgaris, rettgeri, stuartii, morganii, sp.)</i>	88	4
<i>Bacillus sp.</i>	89	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85	4
<i>Candida (albicans, glabrata, tropicalis, parapsilosis, krusei)</i>	78	3
<i>Citrobacter (freundii, diversus, koseri)</i>	26	1
<i>Pseudomonas spp.</i>	13	0,6
<i>Lactobacillus spp.</i>	9	0,5
<i>Acinetobacter spp.</i>	5	0,2
<i>Stenotrophomonas maltophilia sp.</i>	5	0,2
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	3	0,1
<i>Serratia (marcescens, liquefaciens gr.)</i>	2	0,1
<i>Aeromonas sp.</i>	2	0,1
<i>Ochrobactrum sp.</i>	1	0,04
<i>Chryseobacterium sp.</i>	1	0,04
<i>Alcaligenes faecalis sp.</i>	1	0,04
<i>Aerococcus sp.</i>	1	0,04
<i>Lactococcus sp.</i>	1	0,04
Всего	2372	

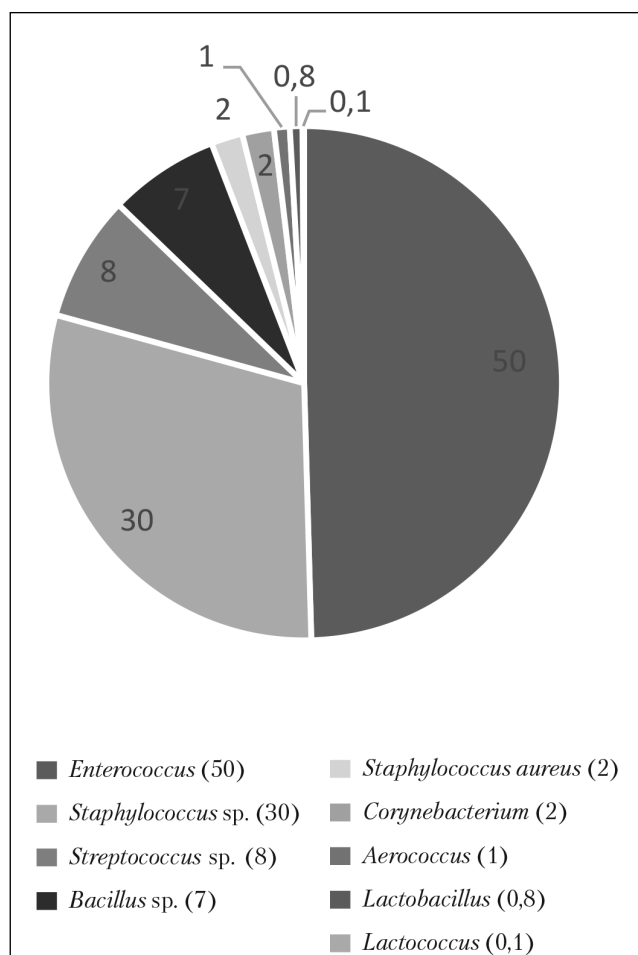


Рис. 1. Спектр грамположительных уропатогенов (n=1258), %

Среди возбудителей уроинфекции преобладали грамположительные бактерии, их выделено 1258 штаммов (53%). Половину среди них составляли культуры рода *Enterococcus* (n=624, 50%) (рис. 1). Культуры рода *Streptococcus* выделялись в 8% случаев (n=106), *Staphylococcus aureus* — в 2% (n=26). Грамотрицательные бактерии (n=1036) составили 44% (рис. 2), среди них доминировали представители семейства Enterobacteriaceae *E.coli* (n=533, 51%), культуры рода *Klebsiella* составили 14% (n=142), *Enterobacter* — 12,5% (n=129), *Proteus* sp. — 8,5% (n=88), *Citrobacter* sp. — 3% (n=26). Грамотрицательные неферментирующие бактерии (ГОНБ) были представлены в основном бактериями *Pseudomonas aeruginosa* — 8% (n=85). Выделено по 5 штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* и *Acinetobacter*, что составило по 0,5%. Однократно были выделены культуры родов: *Ochrobactrum*, *Chryseobacterium*, *Alcaligenes*, что составило по 0,1%. В 3% посевов мочи обнаружен рост грибов рода *Candida* (n=78), из них *C.albicans* — 63% (n=49).

В течение последних 20 лет в лечении инфекций мочевыделительной системы ведущее место

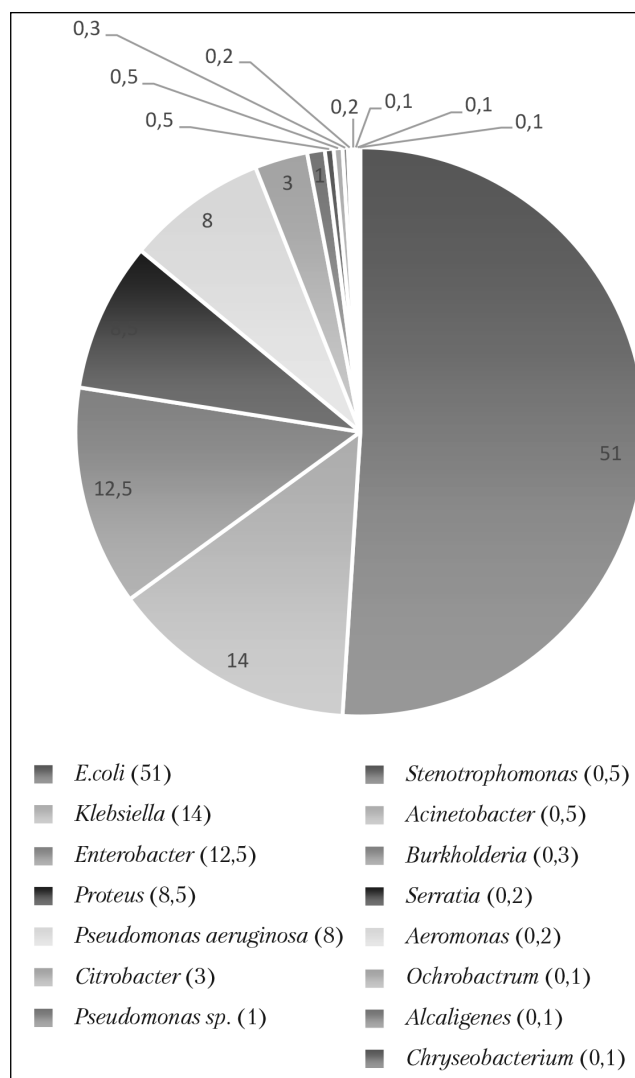


Рис. 2. Спектр грамотрицательных уропатогенов (n=1036), %

занимают фторированные хинолоны, что определяется широким спектром их антимикробной активности, благоприятными фармакокинетическими характеристиками и хорошей переносимостью. Особенно востребованы в клинической практике офлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, гемифлоксацин и др. Общим свойством этой группы антибиотиков является повышенная активность в отношении грамположительных патогенов, особенно пневмококков, в частности это касается левофлоксацина, что позволяет с успехом применять их и при заболеваниях органов дыхания.

Проведённый анализ чувствительности к фторхинолонам (табл. 2—5) показал, что штаммы *E.coli* были резистентны к левофлоксацину в 29% случаев, к моксифлоксацину, офлоксацину и ципрофлоксацину — в 34,8, 37,9 и 42,7%, соответственно. Для патогенов рода *Klebsiella* резистентность к фторхинолонам зависела от вида и была в

Таблица 2. Чувствительность уropатогенов к ципрофлоксацину (в %)

Культура	Всего исследований	S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	396	51,8	5,6	42,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	305	17,7	20,7	61,6
<i>Enterococcus faecium</i>	47	2,1	6,4	91,5
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	86	36,0	4,7	59,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	20,0	10,0	70,0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	71,4	0	28,6
<i>Enterobacter sp.</i>	85	42,4	5,9	51,7
<i>Proteus mirabilis</i>	50	52	6	42
<i>Proteus vulgaris</i>	13	53,8	23,1	23,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68	19,1	11,8	69,1
<i>Acinetobacter sp.</i>	4	0	0	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	52,4	19,0	28,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	156	26,9	16,0	57,1

Примечание. Здесь и табл. 3–6: S – чувствительность; I – промежуточная чувствительность; R – устойчивость.

Таблица 3. Чувствительность уropатогенов к левофлоксацину (в %)

Культура	Всего исследований	S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	162	69,1	1,9	29,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	248	41,9	6,9	51,2
<i>Enterococcus faecium</i>	42	0	4,8	95,2
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	13	38,5	7,7	53,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	50	0	50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	100	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	26	61,5	0	38,5
<i>Proteus mirabilis</i>	15	66,7	0	33,3
<i>Proteus vulgaris</i>	4	50	50	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31	32,3	0	67,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	62,5	18,8	18,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	105	41,9	15,2	42,9

Таблица 4. Чувствительность уropатогенов к офлоксацину (в %)

Культура	Всего исследований	S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	66	59,1	3,0	37,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	102	13,7	24,5	61,8
<i>Enterococcus faecium</i>	26	0	7,7	92,3
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	13	46,2	0	53,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	100	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	100	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	28,6	0	71,4
<i>Proteus mirabilis</i>	5	40	20	40
<i>Proteus vulgaris</i>	2	100	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0	16,7	83,3
<i>Acinetobacter sp.</i>	1	100	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	60	40	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	48	47,9	12,5	39,6

Таблица 5. Чувствительность уropатогенов к моксифлоксацину (в %)

Культура	Всего исследований	S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	92	63,0	2,2	34,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	158	44,3	3,8	51,9
<i>Enterococcus faecium</i>	27	3,7	0	96,3
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	17	41,2	17,6	41,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	50	25	25
<i>Enterobacter sp.</i>	9	11,1	22,2	66,7
<i>Proteus mirabilis</i>	10	60,0	0	40,0
<i>Proteus vulgaris</i>	4	50	0	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	23,8	0	76,2
<i>Acinetobacter sp.</i>	2	0	50	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	55,6	33,3	11,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	56	64,3	17,9	17,9

пределах от 0 до 70%. При инфекции, вызванной ГОНБ, а именно *P.aeruginosa*, резистентность к фторхинолонам была на уровне 67,7–83,3%. Следует отметить, что штаммы *P.aeruginosa* в 67,4%

случаев проявляли высокую чувствительность к фосфомицину (табл. 6), что значительно превосходило активность фторхинолонов в отношении патогена этого вида.

Таблица 6. Чувствительность уропатогенов к фосфомицину (в %)

Культура	Всего исследований	S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	269	82,9	8,6	8,6
<i>Enterococcus faecalis</i>	217	85,3	4,6	10,1
<i>Enterococcus faecium</i>	22	95,5	0	4,5
<i>Klebsiella pneumoniae/pneumoniae</i>	31	38,7	19,4	41,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	45	5	50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	28,6	14,3	57,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	30	26,7	3,3	70
<i>Proteus mirabilis</i>	40	72,5	5	22,5
<i>Proteus vulgaris</i>	5	80	0	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46	67,4	4,3	28,3
<i>Acinetobacter sp.</i>	3	0	33,3	66,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	81,8	0	18,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	49	46,9	0	53,1

При инфекции, вызванной грамположительными уропатогенами, в частности *Enterococcus faecalis*, резистентными к фторхинолонам были: 52% — к моксифлоксацину и левофлоксацину и 62% — к ципрофлоксацину и офлоксацину. Устойчивость *S.aureus* к фторхинолонам — ципрофлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину и офлоксацину — варьировала, составляя 28,6, 18,8, 11,1 и 0%, соответственно.

Активность уросептиков, таких как фосфомицин (см. табл. 6) в отношении большинства культур как грамположительных, так и грамотрицательных была на уровне 67,4—95,5%, кроме возбудителей родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Acinetobacter*, а также *S.epidermidis*.

Из изученных микроорганизмов ($n=2372$), выделенных из мочи, 129 культур были полирезистентными, что составило 5,4%. Они распределялись следующим образом: среди культур *E.coli* — 36 штаммов, *Enterococcus* — 80 штаммов (*E.faecalis* — 64, *E.faecium* — 8, *Enterococcus sp.* — 8), *S.epidermidis* — 8, *P.aeruginosa* — 5 штаммов. С учётом общего числа выделенных штаммов указанных видов бактерий, внутривидовая полирезистентность составила для *Enterococcus* — 13%, *E.coli* — 7%, *P.aeruginosa* — 6%, *S.epidermidis* — 4,5%.

Известно также, что при инфекции мочевыводящих путей, вызванной госпитальными штаммами, развивается биоплёночная инфекция [17, 18] и в таких случаях выбор антибиотиков ограничен. Вместе с тем, существует целый ряд препаратов для лечения инвазивных инфекций, вызванных полирезистентными грамположительными культурами микроорганизмов, в частности энтерококками и метициллинорезистентными стафилококками, это — линезолид, даптомицин, тигециклин и др. Эти антибиотики, применяемые как в монотерапии, так и в комбинации с другими антимикробными препаратами, проникая в очаг инфекции, преодолевают биоплёнку (особенно в сочетании с левофлоксацином) и оказывают положительный клинический исход [19—20].

Таким образом, анализ 2372 штаммов, выделенных из мочи урологических больных показал, что лидирующими уропатогенами были бактерии рода *Enterococcus* и *E.coli*. Чувствительность к фторхинолонам варьировала. Отмечена высокая активность фосфомицина в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных культур, что позволяет рекомендовать данный препарат в качестве профилактики, в частности при эндоскопических процедурах и при применении стратегии эмпирической антимикробной терапии [10, 14].

Фторхинолоны из-за высокого показателя резистентности к ним у большинства уропатогенов (29% и выше), а также возможной селекции полирезистентных возбудителей не рекомендуется назначать рутинно и следует применять при наличии подтверждённой чувствительности к ним, а также при подозрении на наличие инфекции верхних мочевыводящих путей. Более того, рекомендуется резервировать фторхинолоны как препараты с хорошим проникновением в ткани и органы, для лечения тяжёлых инфекций паренхиматозных органов, в частности бактериального пиелонефрита и простатита.

Фторхинолоны из-за высокого показателя резистентности к ним у большинства уропатогенов (29% и выше), а также возможной селекции полирезистентных возбудителей не рекомендуется назначать рутинно и следует применять при наличии подтверждённой чувствительности к ним, а также при подозрении на наличие инфекции верхних мочевыводящих путей. Более того, рекомендуется резервировать фторхинолоны как препараты с хорошим проникновением в ткани и органы, для лечения тяжёлых инфекций паренхиматозных органов, в частности бактериального пиелонефрита и простатита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аляев Ю.Г., Руденко В.И. Эффективная фармакотерапия. Урология и нефрология. 2016; 5: 41. / Aljaev Ju.G., Rudenko V.I. Jeffektivnaja farmakoterapija. Urologija i nefrologija. 2016; 5: 41. [in Russian]
2. Naber K., Bergman B., Bishop M., Bjerklund-Johansen T., Botto H., Lobel B. Лечение инфекций мочевыводящих и мужских половых путей. Методическое руководство европейской ассоциации урологов. Eur Urol 2001; 40: 576—588.
3. Набер К.Г., Бегман Б., Бишоп М.К., Бьерклунд-Йохансен Т.Е., Ботто Г., Лобель Б., Круз Ф.Д., Селвагги Ф.П. Рекомендации Европейской ассоциации урологов по лечению инфекций мочевыводящих путей и инфекций репродуктивной системы у мужчин. Клинический микробиол антимикроб химиотер 2002; 4: 4: 347—363. / Naber K.G., Begman B., Bishop M.K., Bjerklund-Johansen T.E., Botto G., Lobel B., Kruz F.D., Selvaggi F.P. Rekomendacii Evropejskoj asociacii urologov po lecheniju infekcij mochevyvodjashhikh putej i infekcij reproduktivnoj sistemy u muzhchin. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2002; 4: 4: 347—363. [in Russian]
4. Лопаткин Н.А., Деревянко И.И. Неосложнённые и осложнённые инфекции мочеполовых путей. Принципы антибактериальной терапии. РМЖ. 1997; 24: 2. / Lopatkin N.A., Derevjanko I.I. Neoslozhnennye i oslozhnennye infekcii mocheopolovykh putej. Principy antibakterial'noj terapii. RMZh. 1997; 24: 2. [in Russian]
5. Соколова В.И., Орлов В.А., Бабарина М.Б. Терапия инфекций мочевыводящих путей у больных сахарным диабетом. Антибиотики и химиотер 2005; 50: 52—56. / Sokolova V.I., Orlov V.A., Babarina M.B. Terapija infekcij mochevyvodjashhikh putej u bol'nykh sakharным диабетом. Antibiotiki i khimioter 2005; 50: 52—56. [in Russian]

6. *Ronalds A., Ludwig E.* Urinary tract infections in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 1737—1741.
7. *Hoepelman A.I., Meiland R., Geerling S.E.* Pathogenesis and management of bacterial urinary tract infections in adult patients with diabetes mellitus. *J Intern Med* 2003; 254: 3: 280—286.
8. *Saiki J., Vaziri N. D., Barton.* Perinephric and intranephric abscesses: a review of the literature. *West L Med* 1982; 136: 95—102.
9. *Лоран О.Б., Синякова Л.А.* Современная антибиотикотерапия инфекций нижних мочевых путей у женщин в схемах и таблицах: Пособие для врачей. М.: ООО «Медицинское информационное агентство. 2016; 32. / *Loran O.B., Sinjakova L.A.* Sovremennaja antibiotikoterapija infekcij nizhnix mochevykh putej u zhenshhin v skhemakh i tablicakh: Posobie dlja vrachej. M.: ООО «Medicinskoe informacionnoe agentstvo. 2016; 32. [in Russian]
10. *Перепапова Т. С., Козлов Р. С., Руднов В. А., Синякова Л. А.* Антимикробная терапия и профилактика инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2015; 72. / *Perepanova T. S., Kozlov R. S., Rudnov V. A., Sinjakova L. A.* Antimikrobnaja terapija i profilaktika infekcij почек, mochevyvodjashhikh putej i muzhskikh polovykh organov. Federal'nye klinicheskie rekomendacii. M.: 2015; 72. [in Russian]
11. *Лопаткин Н.А., Перепапова Т.С.* Рациональная фармакотерапия в урологии: Compendium. М.: Литтера. 2015; 448. / *Lopatkin N.A., Perepanova T.S.* Racional'naja farmakoterapija v urologii: Compendium. M.: Littera. 2015; 448. [in Russian]
12. *Колонтарев К.Б.* Острый цистит. Рекомендация следовать рекомендациям. Обзор резолюции международного экспертного совета. 2016 год; «Леди Вита»; Март; 2016; 24—25. / *Kolontarev K.B.* Ostryj cistit. Rekomendacija sledovat' rekomendacijam. Obzor rezoljucii mezhdunarodnogo jekspertnogo soveta. 2016 god; «Ledi Vita»; Mart; 2016; 24—25. [in Russian]
13. *Перепапова Т.С.* Резолюции Экспертного Совета, посвященного актуальным вопросам терапии пациентов с инфекцией нижних мочевых путей. Экспериментальная и клиническая урология. 2016; 1: 1—4. / *Perepanova T.S.* Rezoljucii Jekspertnogo Soveta, posvjashhennogo aktual'nyh voprosam terapii pacientov s infekciej nizhnix mochevykh putej. Jekspertnaja i klinicheskaja urologija. 2016; 1: 1—4. [in Russian]
14. Федеральные клинические рекомендации по антимикробной терапии и профилактике инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов. 2017. / *Federal'nye klinicheskie rekomendacii po antimikrobnnoj terapii i profilaktike infekcij почек, mochevyvodjashhikh putej i muzhskikh polovykh organov.* 2017. [in Russian]
15. *Аляев П. В., Глыбочко Д. Ю., Пушкарь Д.Ю.* Урология. Российские клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016; 496. / *Aljaev P. V., Glybochko D. Ju., Pushkar' D.Ju.* Urologija. Rossijskie klinicheskie rekomendacii. M.: GJeOTAR-Media, 2016; 496. [in Russian]
16. *Палагин И.С., Сухорукова М.В. и др., исследовательская группа «ДАРМИС».* Современное состояние антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты исследования «ДАРМИС» (2010-2011). *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2012; 14 (4): 280-302. / *Palagin I.S., Sukhorukova M.V. i dr., issledovatel'skaja gruppa «DARMIS».* Sovremennoe sostojanie antibiotikorezistentnosti vzbuditelej vnebol'nichnykh infekcij mochevykh putej v Rossii: rezul'taty issledovanija «DARMIS» (2010—2011). *Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2012; 14 (4): 280—302. [in Russian]
17. *Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В.* Проблемы в медицине, связанные с бактериальными пленками. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2012; 4: 2: 68—75. / *Ljatin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V.* Problemy v medicine, svjazannye s bakterial'nyimi plenkami. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2012; 4: 2: 68—75. [in Russian]
18. *Романова Ю. М., Мулабаев Н.С., Толордава Э.Р., Серегин А.В., Серегин И.В., Алексеева Н.В., Степанова Т.В., Левина Г. А., Бархатова О.И., Гамова Н.А., Гончарова С.А., Диденко Л.В., Раковская И.В.* Микробные сообщества на мочевых камнях. *Мол генетика, микробиол вирусол* 2015; 33: 2: 20—25. / *Romanova Ju. M., Mulabaev N.S., Tolordava Je.R., Seregin A.V., Seregin I.V., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Levina G. A., Barkhatova O.I., Gamova N.A., Goncharova S.A., Didenko L.V., Rakovskaja I.V.* Mikrobnye soobshhestva na mochevykh kamnjakh. *Mol genetika, mikrobiol virusol* 2015; 33: 2: 20—25. [in Russian]
19. *Богомолова Н.С.* Химиотерапевтическая служба: задачи по профилактике и борьбе с хирургическими инфекциями в ОРИТ. *Анестезиол реаниматол. Медицина*, 2013; 2: 66—72. / *Bogomolova N.S.* Khimioterapevticheskaja sluzhba: zadachi po profilaktike i bor'be s khirurgicheskimi infekcijami v ORIT. *Anesteziol reanimatol. Medicina*, 2013; 2: 66—72. [in Russian]
20. *Богомолова Н. С., Кузнецова С.М., Большаков Л. В.* Роль микробиологического мониторинга и лекарственного анамнеза в эффективности антибиотикопрофилактики и антибиотикотерапии инфекционных осложнений после реконструктивных оперативных вмешательств. *Анестезиол реаниматол* 2015; 60:2: 20—26. / *Bogomolova N. S., Kuznecova S.M., Bol'shakov L. V.* Rol' mikrobiologicheskogo monitoringa i lekarstvennogo anamneza v jeffektivnosti antibiotikoprofilaktiki i antibiotikoterapii infekcionnykh oslozhnenij posle rekonstruktivnykh operativnykh vmeshatel'stv. *Anesteziol reanimatol* 2015; 60:2: 20—26. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Васильева Елена Ивановна — к. б. н., НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД», Москва

Соколова Валентина Ивановна — к. м. н., РМАНПО МЗ России, Москва

Сычев Дмитрий Алексеевич — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии РМАНПО, Москва

Бабарина Мария Борисовна — к. м. н., старший научный сотрудник отделения терапии эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический Научный Центр» Минздрава России, Москва

Микробиологическое обоснование выбора антимикробных препаратов для терапии сальмонеллёза у детей

Л. П. ЖАРКОВА*, Н. Н. СМОЛЯНКИН, А. И. ГРЕКОВА, С. Н. КОЗЛОВ

Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск

Microbiological Justification of the Germicide Selection for the Treatment of Salmonellosis in Children

L. P. ZHARKOVA, N. N. SMOLYANKIN, A. I. GREKOVA, S. N. KOZLOV

Smolensk State Medical University, Smolensk

Проведено определение чувствительности штаммов сальмонелл *in vitro* методом последовательных разведений в бульоне с определением МПК к антимикробным препаратам в соответствии с критериями EUCAST 2015 и Российскими клиническими рекомендациями. Установлена высокая активность цефалоспоринов III поколения (цефотаксим, цефепим), азитромицина, ко-тримоксазола при наличии резистентности сальмонелл к ципрофлоксацину (24,3%).

Ключевые слова: штаммы сальмонелл, МПК антибиотиков, цефалоспорины III поколения, азитромицин, ципрофлоксацин, ко-тримоксазол, дети.

The article presents the data on determination of sensitivity of *Salmonella* strains *in vitro* by the method of serial dilutions in broth with the determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) to antimicrobial agents in accordance with the 2015 EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing European Committee for determination of sensitivity to antimicrobial agents) criteria and national clinical guidelines. The study demonstrated a high pharmacodynamic activity of the III generation cephalosporins (Cefotaxime, cefepime), azithromycin, co-trimoxazole and the presence of *Salmonella* with resistance to ciprofloxacin (24.3%).

Key words: *Salmonella* strains, MIC of antibiotics (III generation cephalosporins, azithromycin, ciprofloxacin, co-trimoxazole), children.

Среди бактериальных инфекций, протекающих с синдромом колита, сальмонеллёз занимает лидирующие позиции у детей раннего и дошкольного возраста [1]. В Смоленской области на протяжении последних 10 лет заболеваемость сальмонеллёзом среди детского населения превышает таковую у взрослых в 2,5 раза [2].

В качестве АМП для эмпирической терапии сальмонеллёзов современными рекомендациями предлагаются препараты группы фторхинолонов (ФХ), цефалоспорины (ЦС) III поколения и триметоприм/сульфаметоксазол (ко-тримоксазол). В педиатрической практике препаратами выбора признаны ЦС III поколения как АМП с природной активностью в отношении сальмонелл, благоприятными фармакокинетическими свойствами, высокой активностью и хорошей переносимостью. Рядом зарубежных исследователей показана высокая клиническая эффективность лечения сальмонеллёза препаратом из группы макролидов — азитромицином [3].

Были получены штаммы сальмонелл от пациентов, участвующих в многоцентровом проспективном сравнительном исследовании по изучению клинической и микробиологической эффективности антимикробных препаратов (АМП) цефиксима и азитромицина при лечении острых кишечных инфекций (ОКИ) с синдромом колита у детей. В большинстве случаев (85,4%) был диагностирован сальмонеллёз, протекающий с высокой лихорадкой и наличием примеси крови в кале. Оба исследуемых АМП продемонстрировали высокую клиническую эффективность: азитромицин (Сумамед®) — 96,6%, цефиксим (Супракс®) — 92,9% и сходную динамику основных клинических симптомов заболевания [4]. При этом микробиологическая эффективность азитромицина (Сумамед®) оказалась выше, чем цефиксима (Супракс®) (81,8 и 52,6%), что послужило основанием для изучения фармакодинамических параметров ряда антибиотиков *in vitro* в целях прогнозирования их клинической эффективности.

Материал и методы

Чувствительность сальмонелл к антибиотикам определяли методом последовательных разведений в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК)

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: 214025 Смоленск, ул. Нахимова, 23—37. СГМУ

АМП, рекомендованных для терапии сальмонеллёза. Результаты интерпретировались в соответствии с критериями EUCAST 2015 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing — Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам) и отечественными клиническими рекомендациями [5].

Результаты исследования

Проведенное микробиологическое исследование установило высокую чувствительность выделенных штаммов сальмонелл к ЦС III поколения — цефотаксиму, цефиксиму (рис. 1, 2).

В ходе исследования были выявлены по 1 штамму сальмонелл с МПК, далеко выходящими за пределы диапазона чувствительности к ЦС III (МПК цефотаксима = 256 мг/л и МПК цефиксима — 512 мг/л).

Все выделенные штаммы сальмонелл по распределению МПК были чувствительны к азитромицину — антибиотику из группы 15-членных макролидов (рис. 3). Пограничное значение МПК азитромицина, по данным EUCAST, установленное только для «диких» штаммов *Salmonella* spp., не превышает 16 мг/л. Исходя из этого штаммы, у которых МПК не превышало 16 мг/л позволило ориентировочно считать их чувствительными к этому препарату [6].

Распределение штаммов сальмонелл по МПК фторхинолонов (рис. 4) показало группирование большинства из них в области низких значений. В группу тестируемых АМП была включена налидиксовая кислота как маркер эпидемиологического мониторинга антибиотикорезистентности сальмонелл. Распределение МПК налидиксовой кислоты для сальмонелл (рис. 5) показало наличие штаммов сальмонелл с МПК, равной 126 и 256 мг/л (по 2,7%), что указывает на снижение чувствительности не только к налидиксовой кислоте, но и возрастанию риска мутаций, обуславливающих устойчивость к ФХ.

В соответствии с международными рекомендациями по определению чувствительности (EUCAST, 2015) и Российскими клиническими рекомендациями выделение сальмонелл с МПК ципрофлоксацина в диапазоне >0,06 мг/л указывает на наличие у них мутаций генов (*gyrA* и *gyrB*), обуславливающих синтез бактериальных ферментов (ДНК-гиразы и топоизомеразы IV) и формирование резистентности тестируемых штаммов сальмонелл к препарату [7].

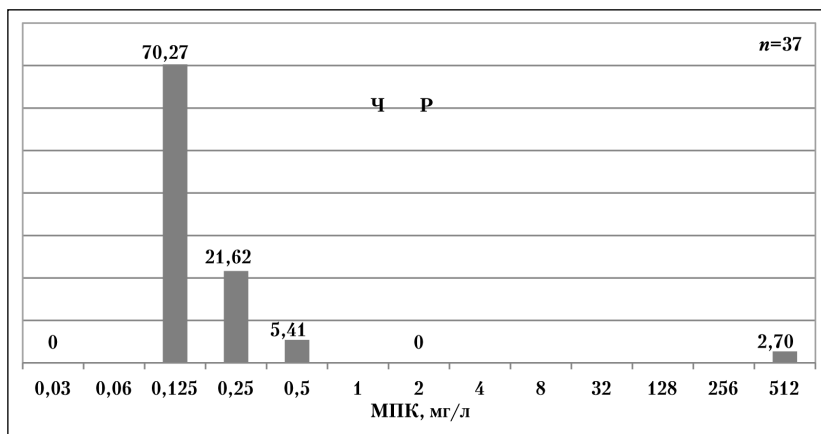


Рис. 1. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к цефиксиму, %.

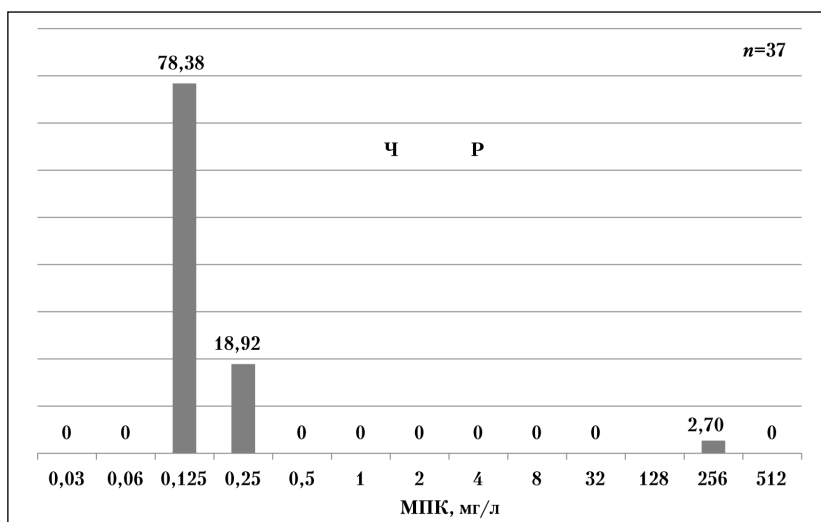


Рис. 2. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к цефотаксиму, %.

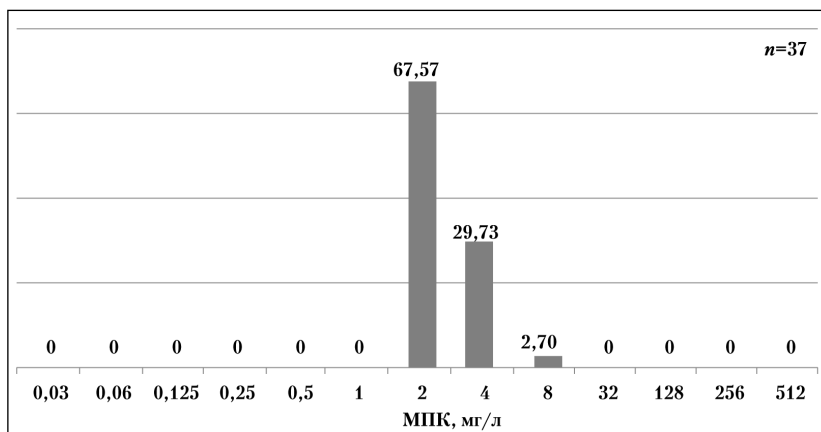


Рис. 3. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к азитромицину, %.

Появление таких штаммов сальмонелл может быть связано с высоким риском клинической неэффективности при эмпирическом подходе выбора АМП.

Появление штаммов сальмонелл с МПК ципрофлоксацина более 0,06 мг/л не позволяет рассматривать его как препарат для эмпирической терапии ОКИ с синдромом колита без определения чувствительности к нему выделенных штаммов.

Тестирование выделенных штаммов сальмонелл по чувствительности к ко-тримоксазолу показало группирование штаммов бактерий в области низких значений МПК, с единичными штаммами в диапазоне значений МПК — 128 мг/л и 256 мг/л (рис. 6).

Полученные результаты тестирования свидетельствуют о чувствительности выделенных штаммов сальмонелл к ко-тримоксазолу и возможность его рекомендации к применению в терапии сальмонеллёзов.

Обсуждение результатов

В современных условиях эффективная антимикробная терапия зависит от точности исследования по определению чувствительности патогенных бактерий в лаборатории. Референтный метод последовательных микроразведений в повседневной практике микробиологических лабораторий не применяется из-за значительной трудоёмкости. Однако именно этот метод используется как «калибрующий» для наиболее распространённого в рутинной практике диско-диффузионного метода. Результаты оценки антибиотикочувствительности бактерий, полученные с помощью референтного метода, используют для обоснования микробиологических и клинических критериев чувствительности [6].

В соответствии с зарубежными и отечественными рекомендациями препаратами выбора для эмпирической терапии сальмонеллёзов у взрослых пациентов являются фторхинолоны, цефалоспорины III поколения, ко-тримоксазол и

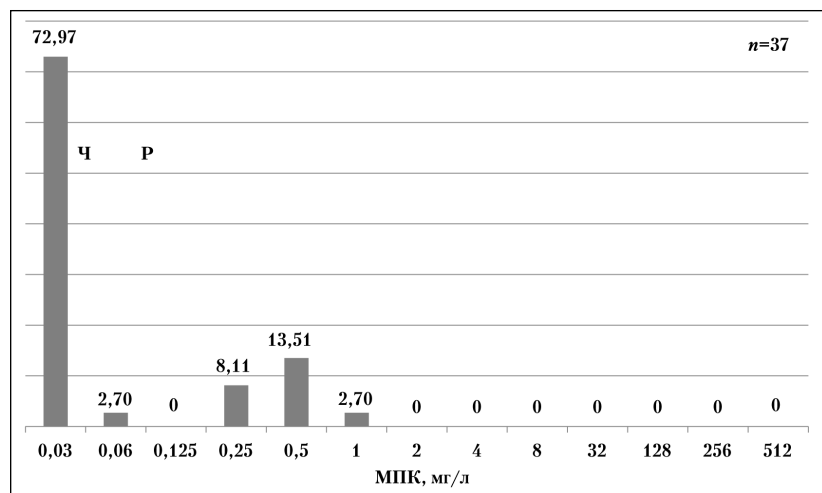


Рис. 4. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к ципрофлоксацину, %.

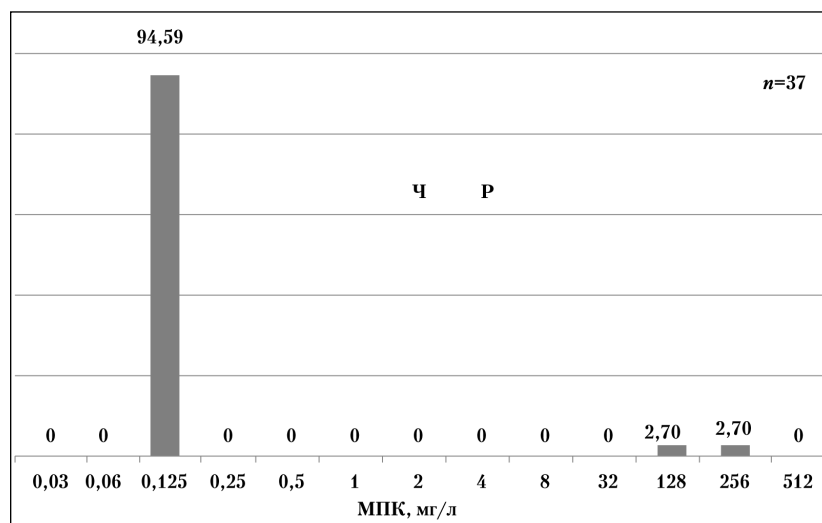


Рис. 5. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к налидиксовой кислоте, %.

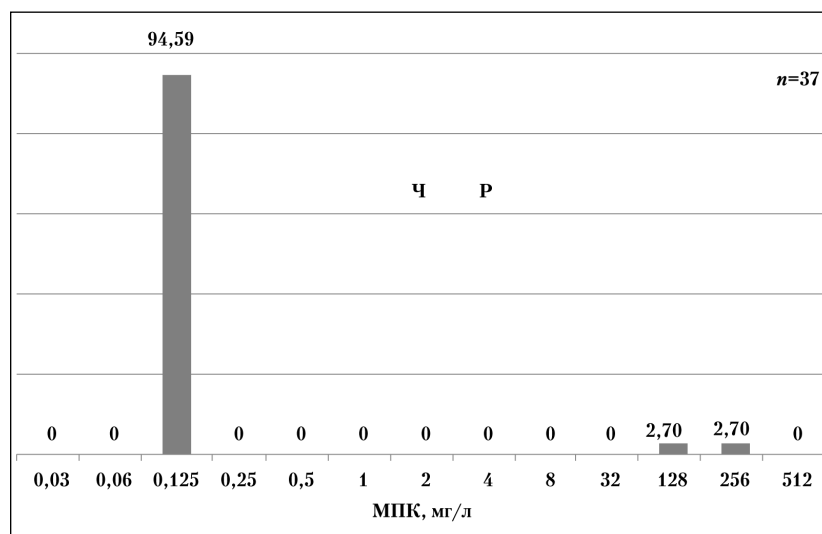


Рис. 6. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к ко-тримоксазолу, %.

азитромицин. В то же время в педиатрической практике таковыми признаны ЦС III поколения, как АМП с природной активностью в отношении сальмонелл, благоприятными фармакокинетическими свойствами, доказанной высокой эффективностью и хорошей переносимостью [8]. Однако имеются публикации о появлении устойчивых к ЦС штаммов *Salmonella*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), что может повлиять на эмпирическое назначение данных препаратов. В России частота выделения таких штаммов среди сероваров *S.virchow*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.newport*, по данным различных исследователей, составляет 0,2–10,0% [7–10]. Кроме того, обнаружена продукция БЛРС генетической группы СТХ-М и цефалоспориноаз AmpC [7, 11, 12]. Выявление таких штаммов не вызывает затруднений в практике бактериологической лаборатории при условии включения в рутинное тестирование штаммов *Salmonella* как минимум двух ЦС (цефтазидима и цефотаксима) и выполнения подтверждающих тестов (в различных модификациях).

Исследованиями последних лет показано, что в настоящее время в популяции *Salmonella* высока доля штаммов, резистентных к хинолонам [7–9]. Назначение препаратов из группы ФХ возможно в педиатрической практике только при доказанной резистентности к ЦС. Определяющим критерием для назначения препаратов этой группы при лечении сальмонеллёзов являются значения МПК ципрофлоксацина. В ведущих зарубежных рекомендациях по определению чувствительности к АМП (EUCAST — Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к АМП; CLSI — Института клинических лабораторных стандартов США), а также в отечественных клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» [4, 5] предложен особый подход при тестировании чувствительности к ФХ штаммов *Salmonella*. Критерии интерпретации результатов тестирования отличаются от критериев, применяемых для других энтеробактерий.

Рядом авторов опубликованы клинические данные, свидетельствующие о низкой эффективности ципрофлоксацина при лечении системных инфекций, вызванных штаммами *Salmonella* с МПК ципрофлоксацина $>0,06$ мг/л [10–12]. Вследствие этого в лаборатории, определяя чувствительность к АМП, к категории «чувствительный» следует относить только те штаммы *Salmonella*, для которых МПК ципрофлоксацина не превышает 0,06 мг/л [9]. Определение чувствительности диско-диффузионным методом (ДДМ) с использованием диска с ципрофлоксацином (5 мкг) не позволяет достоверно выявить такие штаммы сальмонелл. Около 20% штаммов, резистентных к фторхинолонам при МПК ципрофлоксацина 0,19–0,125 мг/л, по результатам тестирования ДДМ попадают в категорию «чувствительный» (диаметр зоны задержки роста вокруг диска с ципрофлоксацином больше 30 мм) [6].

В настоящее время известно, что в большинстве случаев устойчивость к ФХ у штаммов сальмонелл, вызванная мутациями в генах *gyrA* и *gyrB*, определяющих синтез бактериальных ферментов (ДНК-гиразы и топоизомеразы IV), развивается ступенчато. Поэтому можно повысить чувствительность ДДМ, включив в тестирование диск с налидиксовой кислотой — наиболее чувствительным АМП, который первым из группы хинолонов реагирует на появление резистентности, обусловленной единичными мутациями. Кроме того, в отечественных клинических рекомендациях [5] и рекомендациях EUCAST при определении чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам ДДМ рекомендовано использовать диск с пefлоксацином (5 мкг) в качестве индикаторного диска. В случае если зона задержки роста менее 24 мм, то штамм следует считать «устойчивым» ко всем ФХ [6]. Опыт микробиологов отдельных лабораторий свидетельствует, что достоверность исследования в значительной степени зависит от качества диска с пefлоксацином. Тестирование дисков с пefлоксацином (5 мкг) различных производителей показало, что не все диски обеспечивали точное соответствие зоны задержки роста (менее 24 мм) наличию механизмов резистентности [8,11].

В последние годы для лечения ОКИ с синдромом колита, включая сальмонеллёзы, стал применяться азитромицин. В то же время определение чувствительности штаммов *Salmonella* к этому препарату затрудняет отсутствие критериев интерпретации результатов, полученных как при постановке ДДМ, так и методов разведения [6,7]. В связи с этим в литературе отсутствуют данные о чувствительности штаммов *Salmonella* к азитромицину и частоте выделения устойчивых штаммов. Тем не менее чувствительность штаммов *Salmonella* к азитромицину можно оценить ориентировочно по так называемым «эпидемиологическим точкам отсечения» (ECOFF — Epidemiological cut-off values), сравнивая МПК для изучаемого штамма со значениями МПК, полученными для «дикой» популяции (штаммы, не имеющие мутационных или других приобретённых механизмов устойчивости к конкретному АМП). По данным EUCAST, большая часть популяции сальмонелл имеет диапазон МПК азитромицина 4–16 мг/л. Штаммы, у которых МПК не превышает 16 мг/л, не имеют приобретённых механизмов резистентности к азитромицину, что позволяет ориентировочно считать их чувствительными к этому препарату. Поскольку ДДМ

или метод пограничных концентраций не позволяют получить точное значение МПК, для определения чувствительности к азитромицину следует использовать Е-тест или метод последовательных разведений.

Заключение

Проведённое *in vitro* микробиологическое исследование антибиотикочувствительности ограниченного количества штаммов сальмонелл в педиатрической популяции выявило их высокую чувствительность к ЦС III поколения — цефотаксиму и цефиксиму. В то же время, исследования, проводимые на различных территориях РФ, выявили устойчивость *Salmonella* к препаратам, рекомендованным для лечения сальмонеллёзов — ФХ и ЦС. Несмотря на то что ФХ редко применяются для терапии сальмонеллёзов в педиатрии, современная интерпретация результатов определения МПК в отношении сальмонелл для цiproфлоксацина в нашем исследовании позволяет констатировать появление резистентных сальмонелл к препарату в г. Смоленске, которые составляют 24,3%. Данное обстоятельство указывает на необходимость ограничения ФХ для эмпирической терапии сальмонеллёзов при доказанной их резистентности к ЦС.

Формирование резистентности у штаммов *Salmonella* связано, в первую очередь, с использованием АМП в ветеринарии и сельском хозяйстве. Данные о резистентности штаммов, выделенных от людей, коррелируют с данными, получен-

ными для штаммов, выделенных из пищевых продуктов и от сельскохозяйственных животных [12]. Резистентность штаммов *Salmonella* к АМП, используемым для эмпирического лечения сальмонеллёзной инфекции в качестве препаратов выбора, представляет большую проблему для здравоохранения. Устойчивость к фторхинолонам и ЦС, развивающаяся на фоне утраты чувствительности сальмонелл к «старым» АМП (ампициллин, хлорамфеникол), значительно ограничивает возможности терапии сальмонеллёзов. Полученные нами результаты определения МПК ко-тримоксазола в отношении сальмонелл позволяют рассматривать этот АМП как резервный препарат для эмпирической терапии сальмонеллёза в педиатрической практике.

Авторы статьи выражают признательность сотрудникам бактериологической лаборатории Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии (НИИ АХ) ГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава РФ за проведение исследования по определению МПК микроорганизмов к тестируемым антимикробным препаратам: Кречиковой Ольге Ивановне, заслуженному врачу РФ, к.м.н., заведующей лабораторией клинической микробиологии; Сухоруковой Марине Витальевне, к.м.н., руководителю лаборатории антибиотикорезистентности; Иванчик Натали Владимировне, к.м.н., научному сотруднику лаборатории антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Behtereva M.K., Kvetnaja A.S. Salmonellosis. Handbook of infectious diseases in children / ed. Y.Lobzin. St.Petersburg: SpetsLit, 2013 (in Russian).
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году» Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/486/gd_2015_ds.pdf — (дата обращения: 11.12.16). / Gosudarstvennyj doklad «O sostojanii sanitarno-jepidemiologicheskogo blagopoluchija naselenija v Rossijskoj Federacii v 2015 godu» Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka [Elektronnyj resurs]. - Rezhim dostupa: http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/486/gd_2015_ds.pdf - (data obrashhenija: 11.12.16). [in Russian]
3. Лобзин Ю.В., Якушин С.Б., Захаренко С.М. Практические рекомендации по ведению пациентов с инфекционной диареей по материалам рекомендаций Американского общества инфекционных болезней. Методические рекомендации для клиницистов. Клин микробиол антимикроб химиотер 2001; 2: 163—182. / Lobzin Ju.V., Jakushin S.B., Zakharenko S.M. Prakticheskie rekomendacii po vedeniju pacientov s infekcionnoj diareej po materialam rekomendacij Amerikanskogo obshhestva infekcionnykh boleznej. Metodicheskie rekomendacii dlja klinicistov. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2001; 2: 163—182. [in Russian]
4. Смолянкин Н.Н., Грекова А.И., Жаркова Л.П. Эффективность азитромицина и цефиксима в терпии острых кишечных инфекций с инвазивным типом диареи у детей. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014; 3: 202—211. / Smoljankin N.N., Grekova A.I., Zharkova L.P. Jeffektivnost' azitromicina i cefiksima v terpii ostrыkh kishechnыkh infekcij s invazivnym tipom diarei u detej. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2014; 3: 202—211. [in Russian]
5. Отечественные клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Версия 2015-02. Доступно по URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/clrec-dsma2015.pdf> / Otechestvennye klinicheskie rekomendacii «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimirbnyim preparatam». Versija 2015-02. Dostupno po URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/clrec-dsma2015.pdf> [in Russian]
6. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А., Краева В.Н., Пахомова Г.С. Диагностика внекишечных сальмонеллёзов и особенности определения чувствительности сальмонелл к антибиотикам. Справочник КДЛ 2016; 12: 70—79. / Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Makarova M.A., Kraeva V.N., Pakhomova G.S. Diagnostika vnekišhechnыkh sal'monellezov i osobennosti opredelenija chuvstvitel'nosti sal'monell k antibiotikam. Spravochnik KDL 2016; 12: 70—79. [in Russian]
7. Козырева В.К., Эйдельштейн М.В., Тапальский Д.В. и др. Независимое приобретение резистентности к хинолонам у клонально родственных нозокомиальных штаммов *Salmonella typhimurium* вследствие гипермутабельности. Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 2: 153—161. / Kozyreva V.K., Jejdel'shtejn M.V., Tapal'skij D.V. i dr. Nezavisimoe priobretenie rezistentnosti k khinolonom u klonal'no rodstvennykh nozokomial'nykh shtammov Salmonella typhimurium vsledstvie gipermutabel'nosti. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2012; 2: 153—161. [in Russian]
8. Елиусизова А.Б., Шубин Ф.Н., Кузнецова Н.А., Бахольдина С.И. Чувствительность к фторхинолонам сальмонелл в Сибири и на Дальнем Востоке. Тихоокеанский мед журн 2010; 4: 51—54. / Eliusizova A.B., Shubin F.N., Kuznecova N.A., Bakholdina S.I. Chuvstvitel'nost' k ftorkhinolonam sal'monell v Sibiri i na Dal'nem Vostoke. Tikhookeanskij med zhurn 2010; 4: 51—54. [in Russian]
9. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Кожухова Е.А., Макарова М.А. и др. Резистентность энтеробактерий к антимикробным препаратам выбора при лечении острых кишечных инфекций. Казанский мед журн 2009; 5: 699—704. / Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Kozhukhova E.A., Makarova M.A. i dr. Rezistentnost' jenterobakterij k antimirbnyim preparatam vybora pri lechenii ostrыkh kishechnыkh infekcij. Kazanskij med zhurn 2009; 5: 699—704. [in Russian]
10. Ахметова Л.И., Розанова С.М. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов шигелл и сальмонелл, выделенных в Екатеринбурге. Клин микробиол антимикроб химиотер 2000; 3: 58—62. / Akhmetova L.I., Rozanova S.M. Chuvstvitel'nost' k antimirbnyim preparatam shtammov shigelл i sal'monell, vydelennykh v Ekaterinbурге. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2000; 3: 58—62. [in Russian]

- preparatam shtammov shigell i sal'monell, vydelennykh v Ekaterinburge. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2000; 3: 58—62. [in Russian]
11. Гончар Н.В., Лазарева И.В., Рычкова С.В. и др. Заболеваемость детей сальмонеллёзом и уровень резистентности клинических штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам в Санкт-Петербурге. Журн инфектол 2015; 1: 80—86. / *Gonchar N.V., Lazareva I.V., Rychkova S.V. i dr. Zaboлеваemost' detej sal'monellezom i uroven' rezistentnosti klinicheskikh shtammov sal'monell k antibakterial'nym preparatam v Sankt-Peterburge. Zhurn infektol 2015; 1: 80—86. [in Russian]*
 12. Egorova S., Kaftyreva L., Grimont Patrick A.D., François-Xavier Weill. Prevalence and characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant non-typhoidal Salmonella isolates in adults in St-Petersburg, Russia (2002—2005). Microb Drug Resist 2007; 13: 102—107.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Жаркова Людмила Павловна — д.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск

Смолянкин Николай Николаевич — ассистент кафедры инфекционных болезней у детей Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск

Грекова Антонина Ивановна — к.м.н., заведующая кафедрой инфекционных болезней у детей, Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск

Козлов Сергей Николаевич — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск

Оценка возможности применения метода Култера (электрочувствительных зон) для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах крови человека отечественного производства

А. А. ВОРОПАЕВ, О. В. ФАДЕЙКИНА, Т. Н. ЕРМОЛАЕВА, Д. С. ДАВЫДОВ, Э. Ю. КУДАШЕВА

Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва

The Assessment of the Possibility to Use the Coulter's Method (Electrosensitive Zones) for Identification of Invisible Particulate Matter in Human Blood-Derived Products Produced in Russia

A. A. VOROPAEV, O. V. FADEIKINA, T. N. ERMOLAEVA, D. S. DAVYDOV, E. YU. KUDASHEVA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

В статье представлены результаты изучения возможности применения метода электрочувствительных зон (метода Култера) для оценки показателя «Механические включения (невидимые)» в отечественных лекарственных препаратах крови человека. Исследования проводили на суспензиях латексных частиц, размер и количество которых соответствовало нормируемому для парентеральных препаратов. Суспензии имитировали препараты крови человека, которые предположительно могут содержать некоторое количество невидимых частиц. Определены факторы, которые могут влиять на достоверность результатов испытаний методом электрочувствительных зон: электропроводность испытуемого образца, объём аналитической пробы, степень разведения образца.

Ключевые слова: препараты крови человека, невидимые механические включения, метод Култера (метод электрочувствительных зон).

The article presents the results of the study of the possibility of using the method of electrosensitive zones (Coulter's method) to evaluate the indicator «Particulate matter (invisible)» in domestic medicinal human blood-derived products. The studies were carried out on suspensions of latex particles, the size and quantity of which corresponded to those normalized for parenteral preparations. Suspensions simulated human blood-derived products, which can presumably contain some invisible particles. Factors that can influence the reliability of test results conducted using the method of electrosensitive zones are determined: the electrical conductivity of the test sample, the volume of the analytical sample, the degree of dilution of the sample.

Keywords: human blood-derived products, invisible particulate matter, Coulter's method (method of electrosensitive zones).

Введение

Номенклатура лекарственных препаратов крови человека, выпускаемая отечественными производителями, представлена препаратами альбумина человека, иммуноглобулинов человека нормальных, специфических и специального назначения.

Значительную их часть составляют стерильные лекарственные формы белков плазмы крови человека, предназначенные для введения в организм путём инъекций и/или инфузий, что обусловлено необходимостью создания наиболее оптимальных условий для реализации фармакологического действия их основных действующих веществ с целью достижения требуемого терапевтического эффекта.

Оценка качества лекарственных препаратов для парентерального введения по показателю «Механические включения» — обязательное требование, предъявляемое к данным лекарственным формам.

Отсутствие посторонних подвижных нерасстворимых частиц, за исключением пузырьков газа, случайно присутствующих в растворах препаратов крови человека (видимых механических включений), отечественные производители оценивают поэтапно в определённых выборках продукции визуальным методом в процессе производства и в готовом продукте [1].

Для оценки содержания невидимых механических включений (размером менее 100 мкм) в лекарственных препаратах для парентерального применения, отечественные производители препаратов крови человека должны руководство-

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 127051 Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2. НЦЭСМП

ваться требованиями ОФС.1.4.2.0006.15 «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». Для определения частиц, невидимых невооруженным глазом, рекомендовано использовать три метода: счётно-фотометрический, метод электрочувствительных зон (метод Култера) и метод микроскопии. Счётно-фотометрический и микроскопический методы не пригодны для исследования коллоидных растворов и эмульсий, препаратов с высокой вязкостью [2]. При исследовании мутных лекарственных форм, например, эмульсий, рекомендовано применение метода электрочувствительных зон (метод Култера) после проведения количественного разбавления растворителем, свободным от механических включений. В РФ способ определения невидимых механических включений в окрашенных лекарственных препаратах парентерального применения методом Култера разработан сотрудниками ФГБУ «НЦЭСМП» [3].

Для метода электрочувствительных зон существует ограничение: измерение необходимо выполнять в растворе электролита [4]. Преобладающая часть растворов для парентерального введения являются растворами активных веществ в очищенной воде или воде для инъекций. Вследствие этого, метод Култера для определения невидимых механических включений не является общепризнанным и указан только в отечественной фармакопее последнего издания [2, 5, 6]. Тем не менее, по мнению ряда исследователей, метод электрочувствительных зон является одним из самых перспективных для определения содержания частиц в белковых препаратах [7, 8].

Лекарственные препараты крови человека являются коллоидными белковыми растворами и представляют собой прозрачные или слегка опалесцирующие бесцветные жидкости с концентрацией белка от 4,5 до 20%. Изучение сведений о составе отечественных препаратов крови человека (более 30 наименований) показало, что часть препаратов содержит физиологический раствор (следовательно, метод Култера применим). Для большинства препаратов нет сведений, являются они электролитами или нет, часть препаратов комплектуется водой для инъекций, которая не является электролитом (следовательно, метод Култера не применим). Альбумин человека является препаратом высокой вязкости, поэтому определение невидимых механических включений возможно только при обязательном предварительном разбавлении. Нами было сделано предположение, что достоверного результата испытаний можно добиться путём разбавления образцов отечественных препаратов крови человека изотоническим раствором хлорида натрия, свободным от механических невидимых включений.

Пробные испытания препаратов иммуноглобулина человека нормального и альбумина человека (производство НПО «Микроген») показали противоречивые результаты. Литературные сведения о значениях показателя «невидимые механические включения» в отечественных препаратах крови человека отсутствуют. Поэтому, с целью исключения возможности получения недостоверных результатов при проведении испытаний препаратов крови, обусловленных существующими ограничениями метода и особенностями прибора (счётчика частиц), эксперименты проводили на суспензиях латексных частиц, имитирующих препараты крови человека, которые предположительно могут содержать некоторое количество невидимых частиц.

Цель исследования — экспериментальная оценка возможности применения метода Култера (метода электрочувствительных зон) для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах крови человека отечественного производства.

В процессе выполнения исследования необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ отечественных документов, регламентирующих требования к содержанию невидимых механических включений.
2. Определить факторы, которые могут влиять на достоверность результатов испытаний отечественных препаратов крови человека по определению количества и размера невидимых механических частиц методом Култера.

Материал и методы

Для исследования использовали:

- иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутримышечного введения (производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России);
- альбумин человека, раствор для инфузий 20% (производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России);
- коммерческий изотонический раствор Изотон 2 (производство фирмы Beckman CoulterTM, США);
- суспензии стандартных латексных частиц, размером 10 мкм (lot 9747356, срок годности 22.08.17 г), 20 мкм (lot 9694047, срок годности 19.09.17 г) и 43 мкм (lot 9141040, срок годности 10.07.17 г), производства Beckman Coulter R CC Size Standarts, N.I.S.T. (National Institute of Standards and Technology), США.

На данном этапе эксперименты проводили на суспензии латексных частиц, размер и количество которых приблизительно соответствовали нормируемому в парентеральных препаратах.

Подготовка проб для определения влияния электропроводности на результаты испытания. Растворы с различной концентрацией хлорида натрия готовили путём смешивания деионизованной воды с коммерческим изотоническим раствором Изотон 2. Концентрация хлорида натрия составляла от 0,9 до 0,1%, с шагом 0,1%; 0,09, 0,05 и 0 % (деионизованная вода).

Суспензию латексных частиц готовили путём добавления нескольких капель частиц каждого размера к 10 мл деионизованной воды.

К каждому образцу различной концентрации хлорида натрия добавляли по 0,2 мл приготовленной суспензии частиц. Тщательно перемешивали содержимое образца, медленно пе-

Таблица 1. Требования отечественных документов по содержанию невидимых механических включений

Для лекарственных препаратов, объемом 100 мл и менее	
Счётно-фотометрический метод	
ГФ XIII	РД 42-501-98
Не более 6000 частиц ≥ 10 мкм	Не более 6000 частиц ≥ 5 мкм
Не более 600 частиц ≥ 25 мкм	Не более 600 частиц ≥ 25 мкм
Метод микроскопии	
Не более 3000 частиц ≥ 10 мкм	Не более 5000 частиц $\geq 5-25$ мкм
Не более 300 частиц ≥ 25 мкм	Не более 500 частиц ≥ 25 мкм
Метод электрочувствительных зон	
Не более 6000 частиц ≥ 10 мкм	Нет сведений
Не более 600 частиц ≥ 25 мкм	
Для лекарственных препаратов, объёмом более 100 мл	
Счётно-фотометрический метод	
Не более 25 частиц ≥ 10 мкм	Не более 100 частиц ≥ 5 мкм
Не более 3 частиц ≥ 25 мкм	Не более 4 частиц ≥ 25 мкм
Метод микроскопии	
Не более 12 частиц ≥ 10 мкм	Не более 50 частиц $\geq 5-25$ мкм
Не более 2 частиц ≥ 25 мкм	Не более 3 частиц ≥ 25 мкм
Метод электрочувствительных зон	
Не более 25 частиц ≥ 10 мкм	Нет сведений
Не более 3 частиц ≥ 25 мкм	

Примечание. ГФ XIII Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания; РД 42-501-98 РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств».

реворачивая его 20 раз. Для удаления пузырьков воздуха образец оставляли стоять в течение 2 мин.

Подготовка проб для определения объёма аналитической пробы. В изотоническом растворе хлорида натрия готовили суспензии частиц размерами 10, 20 и 43 мкм. Определение количества невидимых механических частиц проводили методом электрочувствительных зон с применением счётчика частиц MultisizerTM 4E (производство Beckman Coulter, США). Использовали апертуру 100 мкм.

Статистическую обработку результатов измерений проводили, рассчитывая среднее арифметическое значение, стандартное (среднеквадратическое) отклонение с использованием программы Microsoft Excel. Промежуточную прецизионность метода электрочувствительных зон при различных факторах прецизионности (объём аналитической пробы, электропроводность, количество частиц) оценивали по значению относительного стандартного отклонения (коэффициент вариации) результатов измерений.

Результаты и обсуждение

Анализ отечественных документов, регламентирующих требования к содержанию невидимых механических включений в парентеральных препаратах. Изучены отечественные принципы нормирования содержания невидимых механических включений в парентеральных препаратах. Результаты приведены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, ГФ XIII нормирует содержание частиц размером более 10 и 25 мкм. Для метода Култера приняты те же нормы, что и для счётно-фотометрического метода.

Требования отечественного документа РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств» отличаются от фармакопейных требований, поскольку с 1998 г. в нашей стране исследования в этой области прекратились, и инструкция не пересматривалась [9].

Изучение требований ГФ XIII позволило сделать вывод о том, какого размера и количества стандартные латексные частицы должны содержаться в суспензиях, которые будут служить моделью препаратов крови человека.

Изучение влияния электропроводности на результаты испытаний. Для изучения влияния электропроводности образца на результаты испытания проводили измерения на образцах с различной концентрацией электролита, приготовленных по описанной выше методике. Одно измерение состояло из 3 аналитических проб с вычислением среднего количества частиц. Проводили четыре измерения, рассчитывали среднее значение количества частиц каждого размера, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты приведены на рис. 1, 2.

Как следует из данных, приведённых на рис. 1, при снижении концентрации ионов хлорида натрия (NaCl) в растворе до 0,1% не происходит изменений в количестве и размере частиц. При очень низкой электропроводности раствора (0% NaCl) счётчик частиц не выдает результата, на дисплее высвечивается ошибка с просьбой заменить электролит.

При незначительной концентрации электролита (0,05% NaCl) можно получить результат, который отличается от результата анализа проведённого в изотоническом растворе (стандартные условия): изменился размер частиц в меньшую сторону и их количество (синяя линия на рис. 2). Например, для суспензии частиц размером 20 мкм при недостаточной концентрации электролита прибор детектирует эти частицы, как имеющие размер 18 мкм и определяет их количество в 2 ра-

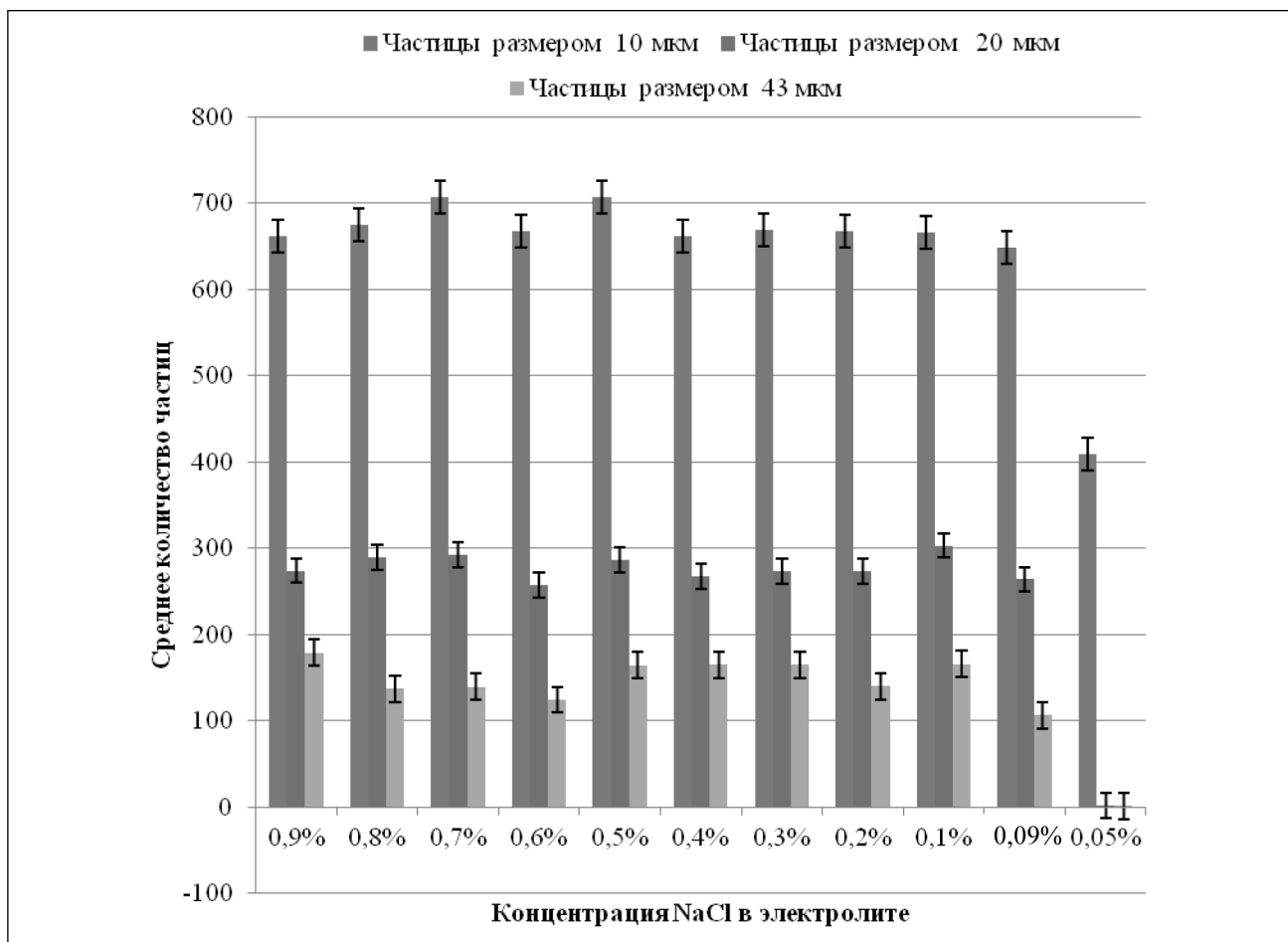


Рис. 1. Влияние концентрации хлорида натрия (NaCl) в исследуемом образце на результат определения среднего количества частиц

за меньше (около 150 шт), чем в стандартных условиях испытаний (около 300 шт).

Из вышеприведённых данных (см. рис. 1, 2) следует, что при анализе образцов с недостаточной или неизвестной электропроводностью можно получить недостоверный результат.

Изучение влияния степени разведения образца. Изучение влияния разведения исследуемого образца изотоническим раствором хлорида натрия провели на суспензии латексных частиц. Результаты приведены в табл. 2.

Как следует из данных, приведённых в табл. 2, при уменьшении количества частиц в суспензии в 2—6 раз, значение коэффициента вариации не

увеличивается ($CV < 3\%$). Следовательно, добавление электролита в недостаточно электропроводные образцы или в образцы с неизвестной электропроводностью не влияет на результат определения количества выявляемых частиц нормируемых размеров. При этом можно рекомендовать разведение образца не более, чем в 6 раз, так как дальнейшее разведение приводит к увеличению ошибки при определении количества частиц с 3,6% (для разведения в 15 раз) до 18,2% (для разведения в 200 раз).

Выбор объёма аналитической пробы. В связи с тем, что в настройках прибора режим дозирования может варьировать от 0,05 мл до 2 мл, необхо-

Таблица 2. Результаты оценки промежуточной прецизионности метода электрочувствительных зон при различном количестве латексных частиц в исследуемом образце ($n=10$)

Среднее количество частиц, шт	Стандартное отклонение, шт	Коэффициент вариации (CV), %
6584	113	1,7
3008	68	2,3
910	17	1,9
449	16	3,6
169	11	6,6
70	10	14,0
31	6	18,2

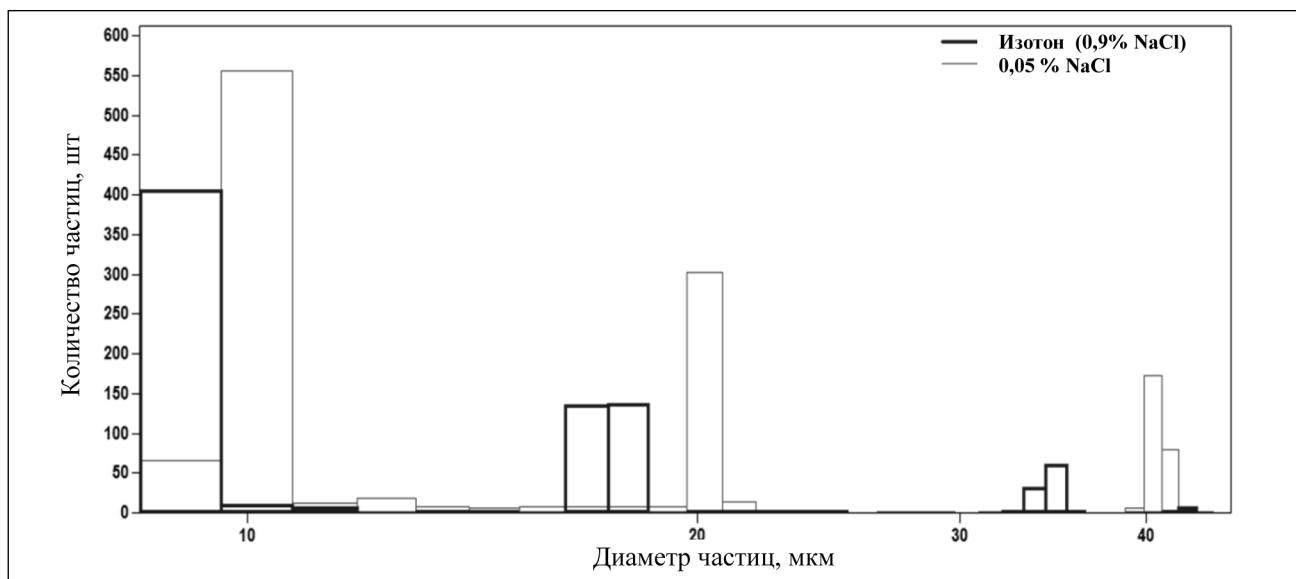


Рис. 2. Сравнение результатов измерения одинакового количества частиц в электролите (линия красного цвета) и в воде для инъекций с добавлением 1 мл изотонического раствора хлорида натрия (концентрация 0,05 % NaCl) (линия синего цвета)

Таблица 3. Результаты оценки промежуточной прецизионности метода электрочувствительных зон при различном объёме аналитической пробы

Объём аналитической пробы, мл	Размер частиц, мкм	Коэффициент вариации (CV), %
0,1	10	7,8
	20	9,2
	40	13,6
1	10	1,8
	20	4,5
	40	5,3
2	10	1,8
	20	1,9
	40	5,0

димо было провести исследования по выбору объёма аналитической пробы.

Для выбора объёма аналитической пробы мы использовали режимы 0,1 мл, 1 мл и 2 мл. Для каждого режима проводили 10 измерений. Каждое измерение состояло из трёх аналитических проб с расчётом среднего значения. Далее по десяти измерениям рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты определения объёма аналитической пробы приведены в табл. 3.

Сравнение значений коэффициентов вариации, приведённых в табл. 3, показало, что наилучший результат имеет место при объёме аналитической пробы 2 мл (коэффициент вариации не более 5 %). Режим дозирования менее 1 мл не может быть рекомендован для проведения испытаний, т.к. существенно возрастает ошибка, которая достигает 13,6%.

Некоторые препараты крови, такие как сывороточный альбумин человека, являются коллоидными растворами, имеют мутность и обладают вязкостью. Для таких препаратов не применимы счётно-фотометрический метод и метод микро-

скопии. ГФ РФ XIII рекомендует в этих случаях использование метода электрочувствительных зон после проведения количественного разбавления препарата соответствующим растворителем.

Для отечественных препаратов крови человека ограничение метода по электропроводности при испытании можно избежать путём их разбавления изотоническим раствором хлорида натрия. На следующих этапах научно-исследовательской работы необходимо провести исследования на отечественных препаратах крови человека по оценке влияния разведения испытуемого образца и выбору аналитической дозы.

Выводы

1. Установлено, что в РФ определение содержания невидимых механических включений в лекарственных препаратах для парентерального применения регламентировано счётно-фотометрическим методом, методом Култера (электрочувствительных зон) и микроскопии.

2. Экспериментально показано, что на результат испытания лекарственных препаратов крови человека по показателю «Механические

включения (невидимые)» методом электрочувствительных зон оказывают влияние такие факторы, как электропроводность испытуемого образца, объём аналитической пробы и степень разведения образца.

Таким образом, использование метода Култера (электрочувствительных зон) для определения

невидимых механических включений в лекарственных препаратах крови человека отечественного производства целесообразно и перспективно. Дальнейшие исследования будут направлены на уточнение и оптимизацию основных параметров методики и проведение валидационных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. ОФС.1.4.2.0005.15 «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» 2: 179—192. / Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izdanie. OFS.1.4.2.0005.15 «Vidimye mekhanicheskie vkljucheniya v lekarstvennykh formakh dlja parenteral'nogo primeneniya» 2: 179—192. [in Russian]
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. ОФС.1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Т.2: 192—199. / Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izdanie. OFS.1.4.2.0006.15 Nevidimye mekhanicheskie vkljucheniya v lekarstvennykh formakh dlja parenteral'nogo primeneniya. T.2: 192—199. [in Russian]
3. Гунар О.В., Новик Е.С., Доренская А.В. Способ определения невидимых механических включений в окрашенных лекарственных средствах. Патент RU2593019, 2015 май 29. / Gunar O.V., Novik E.S., Dorenskaja A.V. Sposob opredeleniya nevidimyx mekhanicheskikh vkljuchenij v okrashennykh lekarstvennykh sredstvakh. Patent RU2593019, 2015 maj 29. [in Russian]
4. Новик Е.С., Гунар О.В. Метод электрочувствительных зон для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах для парентерального применения. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; 1: 58—61. / Novik E.S., Gunar O.V. Metod jelektrochuvstvitel'nykh zon dlja opredeleniya nevidimyx mekhanicheskikh vkljuchenij v lekarstvennykh preparatakh dlja parenteral'nogo primeneniya. Vedomosti Nauchnogo centr jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya 2012; 1: 58—61. [in Russian]
5. European Pharmacopeia. 8th edition. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). 2.9.19 Particulate contamination: sub-visible particle. 2011.
6. United States Pharmacopeia, General Chapters: <788> Particulate matter in injections USP 40-NF35:665-9 Available from: URL: <http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=40&nf=35&s=0&officialOn=May 1, 2017>
7. Barhrad J.G., Rhyner M.N., Carpenter J.F. Critical evaluation and guidance for using the coulter method for counting subvisible particles in protein solutions. J Pharm Sci 2012, 101 (1): 140—153.
8. Subvisible (2—100 µm) Particle Analysis During Biotherapeutic Drug Product Development: Part 1, Considerations and Strategy [editorial]. J Pharm Sci 2015, 104 (6): 1899—1908.
9. Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств (РД-42-501-98); 1998. / Instrukcija po kontrolju na mekhanicheskie vkljucheniya in#ekcionnykh lekarstvennykh sredstv (RD-42-501-98); 1998. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Воропаев Андрей Андреевич — эксперт 2 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Фадеекина Ольга Васильевна — к.б.н., главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Ермолаева Татьяна Николаевна — эксперт 1 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Давыдов Дмитрий Сергеевич — к.м.н., начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Кудашева Эльвира Юрьевна — к.м.н., начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Валидационные процедуры для определения показателя «Бактериальные эндотоксины»

*О. В. ШАПОВАЛОВА¹, П. В. ШАДРИН¹, Н. П. НЕУГODOVA¹, О. В. ГУНАР¹, Г. В. ДОЛГОВА²

¹ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

² ООО НБЦ «Фармбиомед», Москва

Validation Procedures for the Determination of the Indicator «Bacterial Endotoxins»

O. V. SHAPOVALOVA¹, P. V. SHADRIN¹, N. P. NEUGODOVA¹, O. V. GUNAR¹, G. V. DOLGOVA²

¹ Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² NBC «Pharmbiomed», Moscow

Применение ЛАЛ-теста, в качестве метода определения бактериальных эндотоксинов (БЭ), позволяет нормировать содержание примесей, вызывающих пирогенную реакцию у пациентов. Повышению надёжности и воспроизводимости этого метода способствуют валидационные процедуры, которые являются неотъемлемой частью методик определения БЭ и основаны на построении «модельного опыта», где сравнивают испытуемые и контрольные образцы. В зависимости от методики испытаний (гель-тромб или фотометрические тесты) на наличие БЭ применяют соответствующие валидационные процедуры с оценкой необходимых параметров. Цель данной работы — доказать с помощью валидационных процедур возможность взаимозаменяемости методов определения БЭ на примере препарата «Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 500 мг». Методики исследования: Гель-тромб и хромогенный кинетический тесты. Результаты проведенных испытаний подтверждают воспроизводимость и специфичность методик ЛАЛ-теста. Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива подтверждена. В опытах гель-тромб теста для препарата «Цефтриаксон» валидировано разведение 1:160 основного раствора в концентрации 100 мг/мл. Параметры калибровочной кривой в кинетическом хромогенном опыте соответствовали валидационным требованиям ($CV \leq 10\%$ и $r > 0,98$). Определение содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате «Цефтриаксон» фотометрическим методом возможно в том же разведении 1:160, где точность определения БЭ в испытуемом образце $CV < 20\%$, степень извлечения добавленного эндотоксина равна 108%. Выводы. Проведённые исследования на примере лекарственного препарата «Цефтриаксон» доказали возможность взаимозаменяемости методик определения БЭ, что подтверждено необходимыми валидационными процедурами.

Ключевые слова: бактериальные эндотоксины, ЛАЛ-(лизат амёбоцитов люмюлюс)-тест, метод гель-тромб, кинетический хромогенный метод, валидация, мешающие факторы.

The use of the LAL test as a method for determining bacterial endotoxins (BE) allows us to normalize the content of impurities causing a pyrogenic reaction in patients. Increasing the reliability and reproducibility of this method is promoted by validation procedures, which are an integral part of the methods for determining BE and are based on the construction of a «model experiment» where the test and control samples are compared. Depending on the test procedure (gel-clot or photometric tests) for determining the presence of BE, appropriate validation procedures are used to assess the necessary parameters. The purpose of the study: to prove the possibility of interchangeability of the methods for determining BE with the help of validation procedures on the example of the drug «Ceftriaxone powder for intramuscular injection 500 mg». Research techniques: Gel-clot and Kinetic Chromogenic tests. The results of the conducted tests confirm the reproducibility and specificity of the LAL test methods. The sensitivity of the LAL reagent used is confirmed. In the experiments of the gel-clot test for Ceftriaxone, a dilution of 1:160 of the base solution in the concentration of 100 mg/ml was validated. The parameters of the calibration curve in the Kinetic Chromogenic test corresponded to the validation requirements ($CV \leq 10\%$ and $r > 0.98$). Determination of the bacterial endotoxin content in Ceftriaxone by the photometric method is possible at the same 1:160 dilution, where the accuracy of determination of the BE in the test sample is $< 20\%$, the degree of extraction of the added endotoxin is 108%. Conclusions. The conducted studies proved the possibility of interchangeability of the methods for determining the BE on the example of the Ceftriaxon drug, which is confirmed by the necessary validation procedures.

Keywords: bacterial endotoxins, LAL (lyulose amoebocyte lysate) test, gel-clot method, kinetic chromogenic method, validation, interfering factors.

Введение

«Бактериальные эндотоксины» — важнейший показатель безопасности парентеральных лекарственных средств (ЛС), обеспечивающий надле-

жащее качество препаратов. Применение ЛАЛ-теста, в качестве метода определения бактериальных эндотоксинов (БЭ) позволяет нормировать содержание примесей, вызывающих пирогенную реакцию у пациентов.

Повышению надёжности и воспроизводимости этого метода способствуют валидационные процедуры, которые являются неотъемлемой ча-

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: 119002, Россия, г. Москва, Петровский бульвар 8, стр. 2. НЦЭСМП МЗ РФ.
E-mail: shapovalova@expmmed.ru

стью методик определения БЭ и основаны на проведении «модельного опыта», в котором сравнивают испытуемые и контрольные образцы.

Процесс валидации в ЛАЛ-тесте предусматривает проведение двух основополагающих экспериментов:

- «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива или линейности калибровочной кривой», в котором оценивается качество используемых реактивов, работы лаборатории, аналитика и условий проведения метода.

- Выявление наличия мешающих факторов испытуемого ЛС в опытах с ЛАЛ-реактивом. В данном испытании определяют степень ингибирования или потенцирования реакции для каждого испытуемого образца. Процедура актуальна на стадии разработки методики испытаний образца ЛС в неразведённом состоянии или в соответствующем рабочем разведении, но не превышающем максимально допустимое разведение (МДР) [1, 2].

Эти обязательные этапы для всех методик ЛАЛ-теста выполняют в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины» [3] и указаниями производителя, изложенными в инструкции к набору реактивов для ЛАЛ-теста.

В зависимости от методики испытаний применяют соответствующие валидационные процедуры с оценкой необходимых параметров [4].

Общими для всех шести фармакопейных методик определения БЭ являются два валидационных параметра:

Специфичность — способность метода определять БЭ с требуемым уровнем правильности и прецизионности.

Предел обнаружения — минимальная концентрация эндотоксинов в образце, которая может быть обнаружена с помощью валидируемого метода. В гель-тромб тесте предел составляет не более 0,015–0,03 ЕЭ/мл (где ЕЭ — единицы эндотоксина), тогда как в инструментальных методах (турбидиметрическом и хромогенном) — 0,01 ЕЭ/мл и 0,005 ЕЭ/мл, соответственно [5].

При выполнении гель-тромб теста обязательными предварительными анализами являются «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» и «Мешающие факторы», которые выполняют в соответствии с требованиями ОФС [3].

Критериями приемлемости для гель-тромб теста являются:

- среднее геометрическое значение чувствительности растворов стандарта эндотоксина на воде для ЛАЛ-теста в пределах двукратной вариации заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива;

- результаты отрицательного контроля воды для ЛАЛ-теста с отсутствием образования геля [6].

Для фотометрических методик, таких как турбидиметрические и хромогенные, используют специальное программное обеспечение с построением калибровочной кривой контрольных стандартов эндотоксина (КСЭ) и дополнительными показателями валидации:

- Линейность — характеризует пропорциональную зависимость времени реакции в секундах от измеряемого содержания БЭ растворов КСЭ в пределах калибровочной кривой и аналитической области выбранной методики испытания. Линейность считают доказанной, если для всех используемых в опыте растворов КСЭ абсолютное значение коэффициента линейной корреляции (r) не ниже 0,980, а значение коэффициента вариации (соотношения стандартного отклонения и среднего значения, выраженного в процентах, далее CV) не превышает 10% [7].

- Правильность — близость полученных результатов к истинному значению, которая характеризует систематическую ошибку. Её выражают в процентах восстановления БЭ и определяют как степень извлечения концентрации БЭ, внесённых в виде КСЭ в испытуемый образец ЛС. Проба положительного контроля ЛС выдерживает испытание, если процент извлечения концентрации БЭ (RSD) находится в диапазоне 50–200% от номинального значения [8, 9].

- Точность — степень близости результата измерений к принятому опорному значению. В данном случае характеризуется величиной CV характеристик калибровочной кривой и CV значений повторностей для образцов. Для отрицательного контроля испытуемого образца значение CV должно быть ≤ 10 или $\leq 25\%$ (в зависимости от требований, установленных производителем ЛАЛ-реактива). Чем ниже значения, тем ближе уровень точности между повторностями испытуемого образца [10, 11].

- Прецизионность — степень близости результатов друг к другу. Во всех опытах ЛАЛ-теста обязательна постановка испытуемых проб как минимум в двух повторностях.

В турбидиметрических и хромогенных методиках оценивают вышеуказанные параметры с использованием процедур, которые подтверждают заявленную линейность калибровочной кривой, и одновременно в этом же опыте валидируют рабочее разведение испытуемого образца. Испытание выполняют для оценки таких показателей стандартной калибровочной кривой, как r и CV , а также подтверждения или опровержения влияния испытуемого раствора ЛС на результаты испытания, то есть установления мешающих факторов [12].

Для проведения валидационных испытаний готовят растворы контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), не менее чем в трёх концент-

рациях для получения стандартной кривой. Используют как минимум две повторности для каждой концентрации КСЭ, в соответствии с рекомендациями производителя ЛАЛ-реактива (учитывая соотношение объема проб, время инкубации, температуру, pH реакционной смеси и т. д.) [13].

Результаты испытания соответствуют требованиям если:

- содержание БЭ, полученное в отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль), не превышает предельное значение, соответствующее чувствительности используемого ЛАЛ-реактива;

- для калибровочной кривой $CV \leq 10\%$ и $r > 0,98$;

- для испытуемого раствора образца значение $CV \leq 10\%$ или $\leq 25\%$;

- измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор образца, находится в пределах $50\% - RSD - 200\%$.

Повторную валидацию методик испытания выполняют в том случае, если:

- получены неудовлетворительные результаты опыта;

- внесены изменения в условия эксперимента, влияющие на результаты испытания [10].

Кроме того, можно рассмотреть возможность проведения повторных валидационных процедур с помощью другой методики, которая благодаря её специфическим особенностям, позволит получить более достоверные результаты. Так, например, выполнить определение БЭ не основной арбитражной методикой гель-тромб тест, а с помощью фотометрических методик, обладающих наиболее высокой чувствительностью ЛАЛ-реактива.

Цель данной работы: доказать с помощью валидационных процедур возможность взаимозаменяемости методик определения БЭ на примере препарата «Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 500 мг».

Материал и методы

Испытуемый препарат. «Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 500 мг» («Цефтриаксон»).

Методики исследования. Гель-тромб тест и хромогенный кинетический тест [3].

Реактивы. Набор реактивов для гель-тромб теста: ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл (где ЕЭ — единицы эндотоксина), контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ). Набор реактивов для хромогенного кинетического теста: ЛАЛ-реактив с хромогенным субстратом, КСЭ. Вода для ЛАЛ-теста.

Используемое оборудование. Суховоздушный нагревательный прибор для инкубации при температуре 37°C , фотокориметр для микропланшетов со специальным программным обеспечением на персональном компьютере, автоматические дозаторы с переменным объемом 20—200 мкл и 100—1000 мкл, встряхиватель (вихревая мешалка), pH-метр, секундомер, штативы для пробирок.

Материалы. Наконечники для автоматических дозаторов, стеклянные круглодонные пробирки с диаметром 13 мм и 10 мм, микропланшеты 96-луночные.

Результаты и обсуждение

1. Испытания препарата «Цефтриаксон» с помощью гель-тромб теста. Непосредственно перед испытанием препарата «Цефтриаксон» осуществляли процедуру «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» [3]. Результаты контрольного эксперимента (табл. 1) показали, что чувствительность используемого ЛАЛ-реактива не менее 0,5 л и не более 2 л, то есть полученная в испытании величина чувствительности ЛАЛ-реактива не отличается более чем в два раза от величины чувствительности ЛАЛ-реактива, заявленной фирмой-производителем. Это позволяет использовать данную пару (реактив и КСЭ) в дальнейших испытаниях. В отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста не наблюдалось гелеобразования реакционной смеси, что свидетельствует об отсутствии определяемого количества эндотоксина.

Затем приступали к испытанию препарата «Цефтриаксон», который разводили водой для ЛАЛ-теста для приготовления исходного раствора с концентрацией 100 мг цефтриаксона в 1 мл. Значение максимально допустимого разведения исходного раствора препарата (МДР) рассчиты-

Таблица 1. Результаты опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива ($\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл)» с помощью гель-тромб теста

Параллельные пробы №	Разведения КСЭ				Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)	Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Логарифм (lg) концентрации эндотоксина
	2λ	λ	0,5 λ	0,25 λ			
	0,06 ЕЭ/мл	0,03 ЕЭ/мл	0,015 ЕЭ/мл	0,0075 ЕЭ/мл			
1	+	+	—	—	—	0,03	—1,5229
2	+	+	—	—	—	0,03	—1,5229
3	+	+	—	—		0,03	—1,5229
4	+	—	—	—		0,06	—1,2219
Сумма логарифмов концентраций эндотоксина							—5,7906
Сумма, разделенная на количество параллельных проб							—1,44765
Антилогарифм полученной величины — среднее геометрическое концентрации эндотоксина							0,0357 ЕЭ/мл

Примечание. Обозначение конечного результата гель-тромб теста: «+» — наличие геля, «—» — отсутствие геля.

Таблица 2. Результаты опыта «Мешающие факторы» с раствором препарата «Цефтриаксон» 100 мг/мл с помощью гель-тромб теста

Рабочее разведение исходного раствора препарата 1:160								
Повторность №	Разведения КСЭ				Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции эндотоксина	Среднее геометрическое значение концентрации	Отрицательный контроль	
	2 λ	λ	0,5 λ	0,25 λ				
на воде для ЛАЛ-теста								
1	+	+	+	—	0,015 ЕЭ/мл	0,015 ЕЭ/мл	Вода для ЛАЛ-теста	Раствор препарата
2	+	+	+	—	0,015 ЕЭ/мл			
на растворе препарата								
1	+	+	+	—	0,015 ЕЭ/мл	0,015 ЕЭ/мл	—//—	—//—
2	+	+	+	—	0,015 ЕЭ/мл			
3	+	+	+	—	0,015 ЕЭ/мл		—//—	—//—
4	+	+	+	—	0,015 ЕЭ/мл		—//—	—//—

вали с учётом нормы предельного содержания БЭ (0,05 ЕЭ/мл), чувствительности используемого ЛАЛ-реактива (полное математическое значение $\lambda = 0,03125$ ЕЭ/мл) и концентрации препарата (100 мг/мл).

$$\text{МДР} = \frac{(0,05 \text{ ЕЭ/мл} \times 100 \text{ мг/мл})}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 160$$

Величина рН реакционной смеси испытуемого раствора в разведении 1:160 составляла 6,8 и соответствовала оптимальному диапазону значений для проведения теста (рН 6—8). Результаты валидации разведения 1:160 подтвердили, что чувствительность ЛАЛ-реактива, определённая с КСЭ в разведении на воде для ЛАЛ-теста во всех опытах, отличается менее чем в два раза, от чувствительности ЛАЛ-реактива, определённой с КСЭ в разведении

на растворах образцов исследуемого препарата (табл. 2). Это означает, что испытуемый препарат в выбранном разведении, не только не ингибирует реакцию гелеобразования, но и не потенцирует её.

2) Испытания препарата «Цефтриаксон» с помощью хромогенного кинетического теста. Сначала готовили основные растворы препарата с концентрацией 100 мг/мл. Рассчитывали значение МДР с учётом нормы предельного содержания бактериальных эндотоксинов (0,05 ЕЭ/мл), чувствительности используемого ЛАЛ-реактива ($\lambda = 0,005$ ЕЭ/мл) и концентрации препарата (100 мг/мл).

$$\text{МДР} = \frac{(0,05 \text{ ЕЭ/мл} \times 100 \text{ мг/мл})}{0,005 \text{ ЕЭ/мл}} = 1000$$

Для проведения испытания готовили растворы стандартов эндотоксина с концентрацией 5 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,005 ЕЭ/мл. Параллельно с ними готовили растворы препарата «Цефтриаксон» в разведении 1:160. Концентрация положительного контроля препарата составляла 0,5 ЕЭ/мл.

Затем в компьютерную программу вводили данные об испытуемых растворах и условиях проведения теста (данные о реактивах, количество повторностей и концентрации растворов КСЭ для построения калибровочной кривой). В каждую ячейку микрорепланшета добавляли испытуемые рас-

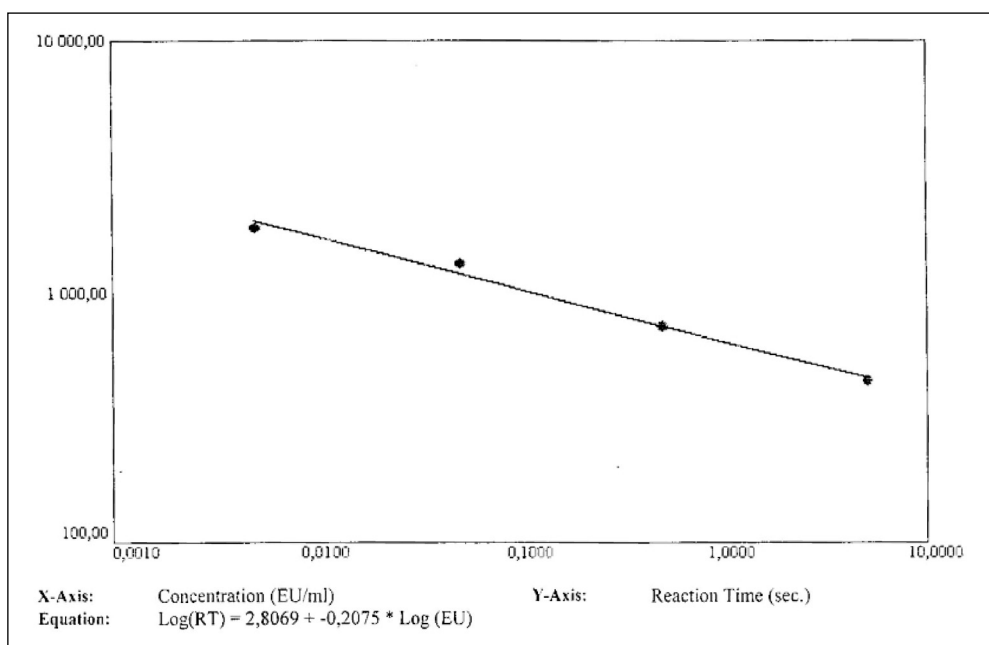


Рис. 1. Калибровочная кривая растворов стандарта эндотоксина с концентрациями 5 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,005 ЕЭ/мл (по оси ординат — время реакции; по оси абсцисс — концентрация эндотоксина, ЕЭ/мл)

Ident.	Expected Concentration	Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Standard Deviation	CV%	CV < 10%	Calculated Value
STD9	5 EU/mL	B5	450,9	445,3	5,64	1,27	PASS	>5,0000
		B6	439,7					
STD10	0,5 EU/mL	C5	737,6	739,0	1,32	0,18	PASS	0,5039
		C6	740,3					
STD11	0,05 EU/mL	D5	1316,7	1311,7	5,00	0,38	PASS	0,0317
		D6	1306,7					
STD12	0,005 EU/mL	E5	1808,6	1808,0	0,54	0,03	PASS	0,0068
		E6	1807,5					

Рис. 2. Результаты опыта «Подтверждение заявленной линейности калибровочной кривой с помощью кинетического хромогенного теста»

творы и ЛАЛ-реактив, затем устанавливали его в инкубирующее считывающее устройство фотокolorиметра. Запускали процесс считывания результатов, которые в реальном времени отображались на экране монитора компьютера.

После окончания опыта распечатывали протоколы испытаний с параметрами калибровочной кривой и результатами испытания препарата (рис. 1).

Коэффициент вариации для растворов стандарта эндотоксина всех четырёх концентраций не превышал 10%, а абсолютное значение коэффициента корреляции диапазона концентраций эндотоксина составляло 0,9940 (рис. 2), что свидетельствовало о линейности стандартной кривой.

Установлено, что содержание БЭ в препарате «Цефтриаксон» составило менее 0,2 ЕЭ/мл, при этом степень извлечения внесённого положительного контроля была 108% (рис. 3).

Результаты проведённых испытаний подтвердили воспроизводимость и специфичность методик ЛАЛ-теста.

В гель-тромб тесте среднее геометрическое концентрации эндотоксина составило $\lambda=0,0357$ ЕЭ/мл и менее чем в два раза отличалось от заявленной величины чувствительности ЛАЛ-реактива ($\lambda=0,03$ ЕЭ/мл). В отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста было зафиксировано отсутствие геля.

Параметры калибровочной кривой кинетического опыта соответствовали валидационным требованиям ($CV \leq 10\%$ и $r > 0,98$): значения коэффициента вариации для всех используемых в опыте растворов КСЭ (5 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,005 ЕЭ/мл) составляли 1,27%, 0,18%, 0,38%, 0,03%, соответственно, а значение коэффициента корреляции $r=0,9940$. Содержание БЭ, полученное в отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста, не превышало предельное значение, соответствующее чувствительности используемого ЛАЛ-реактива и составило менее 0,005 ЕЭ/мл. Следовательно, полученные результаты одновременно подтвердили как пригодность реактивов и условий для проведения анализов, так и квалификацию сотрудников.

	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%	
Well Layout						
H5	>1860,0	>1860,0	<0,2000 EU/mL	<0,2000 EU/mL	> 0,00	
H6	>1860,0		<0,2000			
Criteria Computations:						
Name:	SPL3		Spike Identifier:	SPK3		
Condition:	CV(SPL3.RTIME) < 20%		Theoretical Spike Value:	0,5		
Status:	PASS		Spike Recovery:	50 <= SPK3.RY <= 200 : PASS		
	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%	Spike Recovery %
Well Layout						
A7	726,7	726,7	0,5464 EU/mL	0,5464 EU/mL	0,00	108
A8	726,7		0,5464			
Criteria Computations:						
Name:	SPK3					
Condition:	CV(SPK3.RTIME) < 20% AND 50 <= SPK3.RY <= 200					
Status:	PASS					

Рис. 3. Результаты опыта «Мешающие факторы» с раствором препарата «Цефтриаксон» с помощью кинетического хромогенного теста

В опытах гель-тромб теста для препарата «Цефтриаксон» валидировано разведение основного раствора 1:160 с концентрацией 100 мг/мл, которое может служить рабочим и использоваться при рутинном определении показателя «Бактериальные эндотоксины». Установлено, что для данного разведения коррекции рН не требуется.

В опытах с помощью кинетической хромогенной методики показана возможность определения содержания БЭ в препарате «Цефтриаксон» в рабочем разведении 1:160. Это подтверждено экспериментальными данными валидационного испытания: точность определения БЭ в испытуемом образце $CV < 20\%$, а степень извлечения эндотоксина, добавленного к раствору положительного контроля препарата «Цефтриаксон» составляла 108%, что укладывается в требуемый диапазон (RSD 50—200%).

Заключение

Проведённые валидационные процедуры свидетельствуют о возможности определения БЭ

в препарате «Цефтриаксон» с помощью тестов гель-тромб и кинетического хромогенного. Показано, что достоверную оценку наличия БЭ допустимо осуществлять с помощью любых вышеуказанных методик в валидованном разведении 1:160, при котором все критерии приемлемости соответствуют заявленным нормам.

Однако необходимо подчеркнуть, что данные, полученные в тесте гель-тромб, фиксировали и оценивали визуально, тогда как при использовании хромогенного кинетического теста с помощью программного обеспечения создавали протоколы испытаний, в которых отражены результаты валидационных процедур.

Таким образом, исследования, проведённые на примере лекарственного препарата «Цефтриаксон», доказали возможность взаимозаменяемости методик определения БЭ, что подтверждено необходимыми валидационными процедурами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгова Г.В., Неугодова Н.П., Шаповалова О.В., Сапожникова Г.А., Аладышева Ж.И. Определение бактериальных эндотоксинов в фармацевтических субстанциях, используемых для изготовления инфузионных растворов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2006; 2: 67—74. / Dolgova G.V., Neugodova N.P., Shapovalova O.V., Sapozhnikova G.A., Aladysheva Zh.I. Opredelenie bakterial'nykh jendotoksinov v farmaceuticheskikh substancijakh, ispol'zuemykh dlja izgotovlenija infuzionnykh rastvorov. Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya. 2006; 2: 67—74. [in Russian]
2. Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Сапожникова Г.А. Методические подходы к разработке показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2012; 3: 47—50. / Shapovalova O.V., Neugodova N.P., Dolgova G.V., Sapozhnikova G.A. Metodicheskie podkhody k razrabotke pokazatelja «Bakterial'nye jendotoksiny» v farmaceuticheskikh substancijakh. Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya. 2012; 3: 47—50. [in Russian]
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд., «Бактериальные эндотоксины» ОФС.1.2.4.0006.15. / Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XIII izd., «Bakterial'nye jendotoksiny» OFS.1.2.4.0006.15. [in Russian]
4. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices, 1987; 54.
5. Rustichelli D., Castiglia S., Gunetti M., Mareschi K., Signorino E., Muraro M., Castello L., Sanavio F., Leone M., Ferrero I., Fagioli F. Validation of analytical methods in compliance with good manufacturing practice: a practical approach. Journal of Translational Medicine, 2013; 2—13.
6. Sandle T. Variability and Test Error with the LAL Assay. Search American Pharmaceutical Review, 2014; 17(6): 22—28.
7. Guimarães R.C., Xavier A. A. et al. Analytical Validation of LAL Kinetic Assay for Detection and Quantification of Endotoxins in Measles's Vaccine Diluents. International Journal Brazilian archives of biology and technology, 2006; Vol. 49: 59—64.
8. Richardson K., Novitsky T.J. Simple Statistics for the LAL User — Standard Deviation, Repeatability, Reproducibility and a Clarification of the Coefficient of Variation. LAL Update, 2002; Vol. 20, No. 4: 6.
9. Jonathan Wong, Nathan Davies, Hasan Jeraj, Enric Vilar, Adie Viljoen, Ken Farrington. A comparative study of blood endotoxin detection in haemodialysis patients, Journal of inflammation; 2016.
10. Syed Imtiaz Haider Validation Standard Operating Procedures: A Step by Step Guide for Achieving Compliance in the Pharmaceutical, Medical Device, and Biotech Industries, 2006; 445—965.
11. Sandle T. Performance Characteristics Of Automated LAL Tests. Pharmaceutical Microbiology Interest Group News 4, 2001; 3 — 6.
12. Hurley J.C., Tosolini F.A., Louis W.J. Quantitative Limulus lysate assay for endotoxin and the effect of plasma. J.Clin.Pathol, 1991; 44 (10): 849—854.
13. Nagarajan K., Chitnis P. K. Part II: Enhancement». BET Newsletter A Charles River Private Limited Communication, 2010; volume 1, Issue 5: 5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шаповалова Ольга Владимировна — Эксперт 1 категории лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Шадрин Павел Валерьевич — Эксперт 1 категории лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Неугодова Наталья Петровна — к. б. н., начальник лаборатории фармакологии Испытательного центра экспер-

тизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Гунар Ольга Викторовна — д. фарм. н., начальник лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Долгова Галина Владимировна — к. б. н., ведущий научный сотрудник ООО НБЦ «Фармбиомед», Москва

Новая методология быстрого мониторинга аутентичности и определения содержания фармацевтических субстанций в антибиотиках без использования стандартных образцов

А. С. ПРОКОПЬЕВ, В. А. ИВЛЕВ*, В. Г. ВАСИЛЬЕВ, С. В. ГОРЯИНОВ, Р. А. АБРАМОВИЧ, Г. А. КАЛАБИН

Российский университет дружбы народов, Москва

New Methodology for Rapid Monitoring of the Authenticity and for Determination of the Pharmaceutical Ingredients of Antibiotics Without the Use of Reference Materials

A. S. PROKOP'EV, V. A. IVLEV, V. G. VASIL'EV, S. V. GORYAINOV, R. A. ABRAMOVICH, G. A. KALABIN

RUDN., Moscow

Проведён анализ некоторых популярных антибиотиков методами количественной спектроскопии ЯМР ¹H и масс-спектрометрии DART без использования стандартных образцов.

Ключевые слова: ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия, количественный анализ.

An analysis of some popular antibiotics was carried out by quantitative ¹H NMR spectroscopy and DART mass spectrometry without the use of reference standards.

Keywords: NMR spectroscopy, mass spectrometry, quantitative analysis.

Введение

В условиях адекватности диагностики заболеваний, последующего выбора химиотерапевтических лекарственных средств (ЛС) и технологии лечения ими, особую важность обретает соответствие состава ЛС заявленному производителем. В практике фармакопейного анализа определение подлинности ЛС и содержания в них фармацевтических субстанций обычно осуществляется методами хроматографии и оптической спектроскопии и сводится к следующим основным этапам: количественное выделение субстанции → идентификация с использованием стандартного образца (СО) → количественное определение с использованием СО.

Независимо от выбранных методов выделения и анализа такой алгоритм безусловно требует наличия СО, что практически затруднительно или даже невозможно в конкретных ситуациях, например, на оптово/розничном этапе продвижения или хранения ЛС. Процесс выделения субстанции может вносить погрешности, учёт которых является довольно трудоёмким. Выявление и идентификация примесей и остаточных растворителей является самостоятельной и наиболее

трудной задачей. Нельзя полностью исключить ошибку в идентификации субстанции, например, при её анализе методом ВЭЖХ с УФ-детектированием, если вместо оригинального препарата используется очень близкое как по времени удерживания, так и по используемой длине волны поглощения индивидуальное вещество.

В Государственную фармакопею РФ Издание XIII впервые введена масс-спектрометрия (МС) как самостоятельный метод физико-химического анализа (ОФС 1.2.1.0008.15). Её использование в форме методик «мягкой ионизации» МС в условиях высокого разрешения позволяет наблюдать ионы, соответствующие молекулярной массе фармацевтической субстанции. Масс-спектрометр с возможностью определения точной массы молекул в режиме DART (Direct Analysis in Real Time), делает возможным за несколько секунд без пробоподготовки установить брутто-формулу субстанции без её выделения. Таким путём достигается частичная идентификация, поскольку развёрнутую структурную формулу субстанции с установлением изомерного и энантиомерного строения и её количественное содержание в ЛС этот метод без наличия СО определить не может. Это достигается использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), которая является прямым первичным методом количественного измерения одной из основных величин в

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: E-mail: chemistron@mail.ru

системе СИ — мольного количества вещества. Метод входит в отечественную Государственную Фармакопею более 30 лет.

Количественная спектроскопия ЯМР протонов (КС ЯМР ^1H) — наиболее распространённый, информативный и экспрессный из методов ЯМР, позволяющий на микрограммовом уровне количественно определять в ЛС фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества и примеси без их выделения и использования СО. Проблема чувствительности, как правило, не является принципиальной, т.к. анализ может осуществляться с тем количеством ЛС, которое за разумное время регистрации спектра (несколько минут) обеспечит желаемую погрешность анализа. Так, при использовании стандартного оборудования (400 МГц, ампула $d=5\text{ мм}$) для молекул массой до 1000 Да достаточно менее 100 мкг аналита, чтобы установить подлинность субстанции и выполнить её количественное определение с погрешностью менее 3%. Главное достоинство метода — отсутствие потребности в СО — обусловлено его физическим принципом, согласно которому интегральные интенсивности сигналов ядер ^1H отдельных компонентов в смеси веществ прямо пропорциональны их мольным долям [1]. Т.е. для определения количественного содержания фармацевтической субстанции в растворе ЛС достаточно добавить в него известное количество выбранного несложного протонсодержащего вещества (эталона) и соотнести площади его сигнала и выбранных индикаторных сигналов субстанции в спектре ЯМР ^1H . Спектр позволяет не только однозначно установить молекулярное и пространственное строение субстанции путём детального анализа одно- и двумерных спектров или сопоставления их с известными или теоретически рассчитанными, но и определить их содержание с желаемой погрешностью. Последняя уменьшается с ростом взятого количества ЛС, длительности эксперимента и некоторых других факторов, детально рассмотренных в обзорных работах [2, 3]. Для быстрого проведения анализа в качестве эталона для количественных определений удобно использовать дейтерорастворители (CDCl_3 , CD_3COCD_3 , CD_3OD , CD_3SOCD_3 , CD_3CN и другие) с известным точным содержанием остаточных протонов, что исключает необходимость процедуры количественного добавления иного эталонного соединения.

Предлагаемая универсальная методология проведения экспертизы подлинности и определения содержания заявленной субстанции включает следующие этапы:

1. Перевод ЛС в раствор приемлемого дейтерорастворителя с контролем полноты извлечения лекарственной субстанции.

2. Подтверждение по точному значению брутто-формулы наличия в ЛС заявленной фар-

мацевтической субстанции путём регистрации экспресс-методом DART масс-спектра высокого разрешения.

3. Подтверждение структурной формулы фармацевтической субстанции и определение её количества в ЛС путём регистрации количественного спектра ЯМР ^1H .

Представленный алгоритм анализа без использования стандартных образцов легко реализовать на основе двух независимых и комплементарных прецизионных методов анализа с использованием ЯМР и МС-спектрометров, имеющихся в аналитических лабораториях контрольных органов, университетов и химических институтов.

Прецизионность, однозначность заключений, быстрота и надёжность, лёгкая валидируемость методик — основные достоинства такого подхода, разработанного и широко используемого нами в течение ряда лет в исследовательской практике (см. например [4, 5]). Многие объекты, представленные на экспертизу подлинности по официальным валидированным фармакопейным методикам в аккредитованный Центр контроля качества лекарственных средств ЦКП (НОЦ) РУДН, были подвергнуты нами независимой экспертизе тандемом МС и ЯМР и показали его быстроту и надёжность.

В настоящем сообщении представлены примеры анализа некоторых антибиотиков: Тетрациклина, Таваника, Азитромицина и Тиенама в форме таблеток, капсул и порошков для приготовления инъекционных растворов, соответственно, широко используемых в химиотерапии, по разработанной нестандартной методологии.

Материал и методы

Тетрациклин — бактериостатический антибиотик группы тетрациклинов, структурная формула которого представлена на рис. 1, а. Нарушает образование комплекса между транспортной РНК и рибосомой, что приводит к подавлению синтеза белка. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов. В ЛС применяется в форме мази и таблеток. Химическое название: [4S-(4альфа,4а альфа,5а альфа,6бета,12а альфа)]-4-(диметиламино)-1,4,4а,5,5а,6,11,12а-октагидро-3,6,10,12,12а-пентагидрокси-6-метил-1,11-диоксо-2-нафтаценкарбоксамид (в виде гидрохлорида или тригидрата). Брутто-формула $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$, $M=444,35\text{ г/моль}$.

В фармакопейном анализе идентификация и количественное определение тетрациклина осуществляется с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, что требует наличия стандартных образцов.

Проведён анализ препарата в форме таблеток, содержащих в пересчёте на активное вещество 100 мг тетрациклина. Вспомогательные вещества — сахароза, краситель арбутин Е-122 и другие, указанные в спецификации. Производитель РУП «Белмедпрепараты», серия 030116, годен до 02.19.

Азитромицин — антибиотик с антибактериальным действием широкого спектра. Химическое название: 9-Деоксо-9а-аза-9а-метил-9а-гомоэритромицин А. Брутто-формула $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{12}$, $M=748\text{ г/моль}$. Структурная формула представлена на рис. 1, б. Проведён анализ препарата в форме капсул, содержащих 250 мг азитромицина дигидрата (в пересчёте на

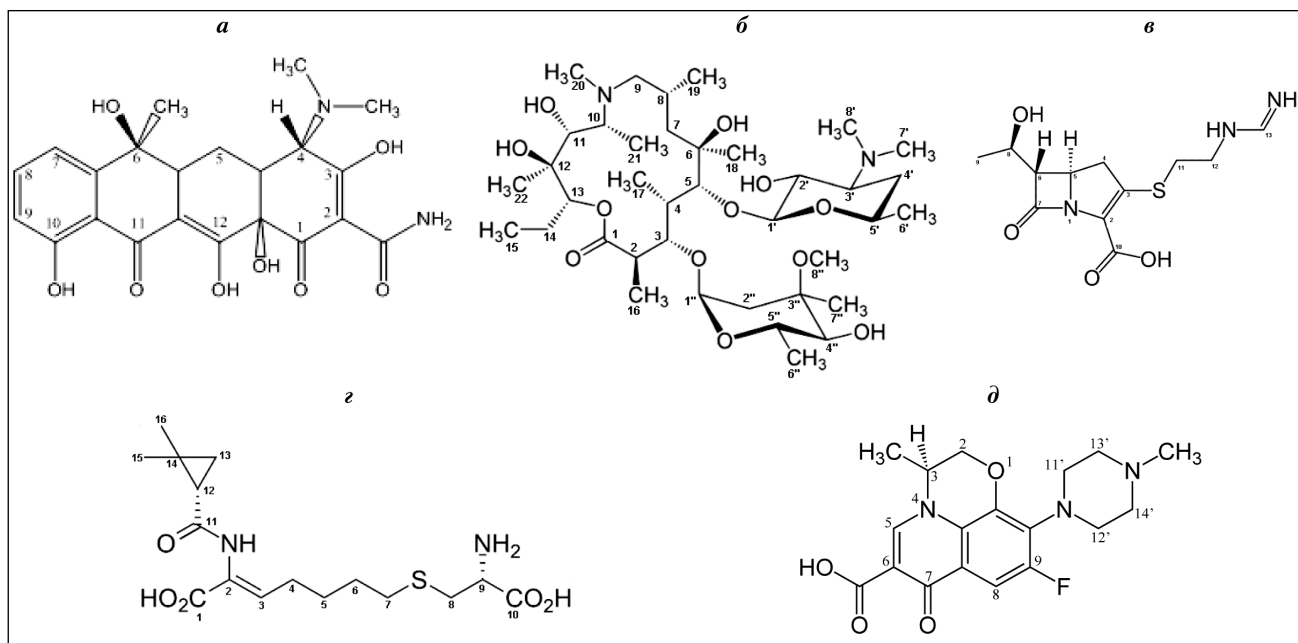


Рис. 1. Структурные формулы: а — тетрациклин; б — азитромицин; в — имипенем; г — циластатин; д — левофлоксацин.

азитромицин). Вспомогательные вещества: натрия лаурилсульфат, магния стеарат, поливинилпирролидон низкомолекулярный, капсулы твердые желатиновые. Производитель ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н. А. Семашко, серия 21214, годен до 01.17.

Тиенам — антибиотик широкого спектра действия, содержащий два компонента. Основной компонент — имипенем — представитель нового класса β -лактамов (группы карбапенемов или тиенамицинов), ингибирующий синтез клеточной стенки бактерий, оказывающий бактерицидное действие в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных патогенных аэробных и анаэробных микроорганизмов. Химическая формула: (5R,6S)-6-[(1R)-1-гидроксиэтил]-3-[(2-[(иминометил)амино]этил)тио]-7-оксо-1-азабицикло[3.2.0]гепт-2-ен-2-карбоновая кислота. Брутто-формула: $C_{12}H_{17}N_3O_4S$, $M=299$ г/моль. Структурная формула представлена на рис. 1, в. Второй компонент (циластатин натрия) — специфический фермент, тормозящий метаболизм имипенема в почках, т.е. увеличивающий концентрацию неизмененного имипенема в мочевыводящей системе. Химическое название: (Z)-7-[(2R)-2-амино-3-гидрокси-3-оксопропил] сульфанил-2-[[1(S)-2,2-диметилциклопропанкарбонил]амино] гепт-2-еновая кислота. Брутто-формула: $C_{16}H_{26}N_2O_5S$, $M=358$ г/моль. Структурная формула представлена на рис. 1, г. Производитель ЗАО «ОПТАТ», серия 0000399598, годен до 20.06.16. Исследование состава выполнено до указанной даты.

Таваник — синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, содержащий в качестве активного вещества левофлоксацин — левовращающий изомер офлоксацина. Левофлоксацин блокирует ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, нарушает суперспирализацию и сшивку разрывов ДНК, ингибирует синтез ДНК, вызывает глубокие морфологические изменения в цитоплазме, клеточной стенке и мембранах микробных клеток. Химическая формула: (-)-(S)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиридо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота гемигидрат. Брутто-формула: $C_{18}H_{20}FN_3O_4$, $M=361,4$ г/моль. Структурная формула представлена на рис. 1, д. Производитель Санофи Винтроп Индустрия, серия 4CF5C, годен до 31.03.19.

Для приготовления растворов образцов антибиотиков использованы следующие дейтерированные растворители и эталоны: D_2O — deuterium oxide for NMR, 99,8% D (Acros organics); $DMSO-d_6$ — methyl sulfoxide- d_6 for NMR, 99,9% D (Acros organics); $methanol-d_4$ (euro-top); $CDCl_3$ — chloroform- d for NMR, 99,8% D (Acros organics); 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid, sodium salt, 98 atom % D (Sigma-Aldrich). Для каждого из них предварительно измерено точное содержание остаточных протонов (погрешность $\pm 0,02\%$), сигналы которых присутствуют в спектрах ЯМР 1H и использованы в качестве эталонных при количественном определении содержания действующих фармацевтических субстанций.

Пробоподготовка. Процедура пробоподготовки таблетированных форм и содержимого капсул состояла в их измельчении путём растирания в ступке, что не требовалось для порошка Тиенама. Часть образца взвешивалась (весы Acculab ATL-220i, погрешность 0,0001 г) и переводилась в раствор в выбранном дейтерорастворителе (метанол- d_4 или $DMSO-d_6$ для тетрациклина, $DMSO-d_6$ для азитромицина, $CDCl_3$ для левофлоксацина, D_2O для Тиенама), образцы перемешивались 1 мин на Vortex, затем 10 мин обрабатывались ультразвуком и помещались на 5 мин в центрифугу. Надосадочная жидкость отбиралась в ампулу для ЯМР диаметром 5 мм. В случае Тиенама в раствор добавляли навеску триметилсилилпропионат натрия d-4 (ТСП) в качестве внутреннего стандарта.

Условия регистрации масс-спектров DART. Определение точных молекулярных масс фармацевтических субстанций в индивидуальных образцах осуществлялось на времяпролетном (разрешение FWHM около 6000) хромато-масс-спектрометре JEOL AccuTOF T-100LP (Япония) с источником ионизации DART. Образцы растворов лекарственных препаратов вносились в ионный источник с помощью стеклянного капилляра. Параметры регистрации спектров: температура ионного источника $300^\circ C$, скорость потока газа (гелий) — 1,0 мл/мин, напряжение на электродах и входном конусе масс-спектрометра — 150 В, 250 В и 3 кВ, соответственно, регистрация положительных ионов, диапазон регистрируемых масс 100—1000 Да. Для калировки шкалы времяпролетного масс-спектрометра в начале и в конце серии измерений ЛС регистрировали масс-спектры ПЭГ (полиэтиленгликоль) с известным элементным составом. Для каждого образца ЛС спектры регистрировали три раза.

Условия регистрации спектров ЯМР ^1H . Регистрация спектров ЯМР осуществлена на спектрометре JEOL JNM ECA 600 (Япония). Параметры регистрации спектров: импульс 90° , задержка между импульсами 20 с (в случае Тиенама 30 с), 16 накоплений, развертка 18 м.д. с установкой несущей частоты 8,0 м.д., 32 К точек на спектр. Обработка спектров проводилась по стандартной методике.

Количественное содержание активных веществ препаратов в навеске определялось сравнением интегральной интенсивности: в случае тетрациклина ароматического протона при С-8 (7,49 м.д.) и сигнала остаточных протонов растворителей (ОПР) DMSO- d_5 (2,5 м.д.) или CD $_3$ OD (3,31 м.д.); в случае азитромицина — совокупность двух отдельно стоящих сигналов в положениях С-1» и С-13 (4,81 м.д. и 4,70 м.д., соответственно) и сигнала ОПР DMSO- d_5 , в случае левофлоксацина — протона в положении С-5 при 8,63 м.д. и сигнала ОПР CDCl $_3$ и рассчитывалось по формуле:

$$m(X) = n(\text{ОПР}) \times (I(X)/N(X)) / (I(\text{ОПР})/N(\text{ОПР})) \times M(X)$$

где m — масса, X — искомое соединение, M — молярная масса, I — интегральная интенсивность сигналов, N — количество протонов, обуславливающих индикаторные сигналы.

В случае Тиенама количественное определение содержания активных веществ препаратов в навеске определялось сравнением интегральной интенсивности сигнала С-9 циластатина при 3,89 м.д. и сигнала С-6 имипенема при 3,41 м.д. с сигналом триметилсилпропионовой кислоты (ТСП) в D $_2$ O (0 м.д.) и рассчитывалось по формуле:

$$m(X) = M(X) \times m(\text{ТСП}) / M(\text{ТСП}) \times ((I(X)/N(X)) / (I(\text{ТСП})/N(\text{ТСП})))$$

Общее содержание активных веществ в таблетке/капсуле/ампуле рассчитывается по формуле:

$$m_{\text{общая}}(X) = m(X) / m(\text{навески}) \times m(\text{таблетки/капсулы/ампулы}).$$

Экспериментальная часть

Для тетрациклина характерно наличие сигналов трёх ароматических протонов в положениях С7, С8 и С9 с химическими сдвигами 7,14, 7,49, 6,90 м.д., соответственно, и гидроксильных групп при С10 и С12 с химическими сдвигами 11,87 и

15,10 м.д., соответственно. Гидроксильные группы не проявляются в спектре ЯМР ^1H препарата, зарегистрированного в CD $_3$ OD, из-за дейтерообмена их протонов. В спектре раствора в DMSO- d_6 сигнал протона при С12 проявляется в виде уширенного синглета, а сигнал протона при С10 — в виде синглета. Это обусловлено тем, что протон С10 группы образует прочную внутримолекулярную водородную связь с соседней карбонильной группой, что предотвращает дейтерообмен с растворителем. Это следует из равенства интегральных интенсивностей сигналов у протона С10 и ароматических протонов тетрациклина. Таким образом, количественное определение тетрациклинов в ЛС может быть проведено как по сигналам ароматических протонов в CD $_3$ OD, так и протона С10 в DMSO- d_6 .

Спектр ЯМР ^1H тетрациклина, полученный в условиях количественного эксперимента в CD $_3$ OD представлен на рис. 2.

Спектр препарата содержит следующие сигналы (CD $_3$ OD, δ , м.д., J/Гц): 1,62 (с, 3H, -CH $_3$); 1,93 (дд, 1H, H-5); 2,10 (ддд, 1H, H-5'); 2,66 (ддд, 1H, H-4a); 2,72 (с, 6H, N(CH $_3$) $_2$); 2,97 (дд, 1H, H-5a); 3,44-3,52 (уш. сигнал, 1H, H-4); 6,90 (д, 1H, J = 8,2, H-9); 7,14 (д, 1H, J = 7,7, H-7); 7,49 (т, 1H, J = 8,1, H-8). Химические сдвиги протонов тетрациклина полностью совпадают с данными литературы [6].

Во взятых навесках массами 43,8 мг (DMSO- d_6) и 49,2 (CD $_3$ OD) проанализированного образца найдено содержание тетрациклина 16,66 и 18,7 мг, соответственно. При пересчёте на 1 таблетку (масса 1 таблетки 268 мг) содержание тетрацик-

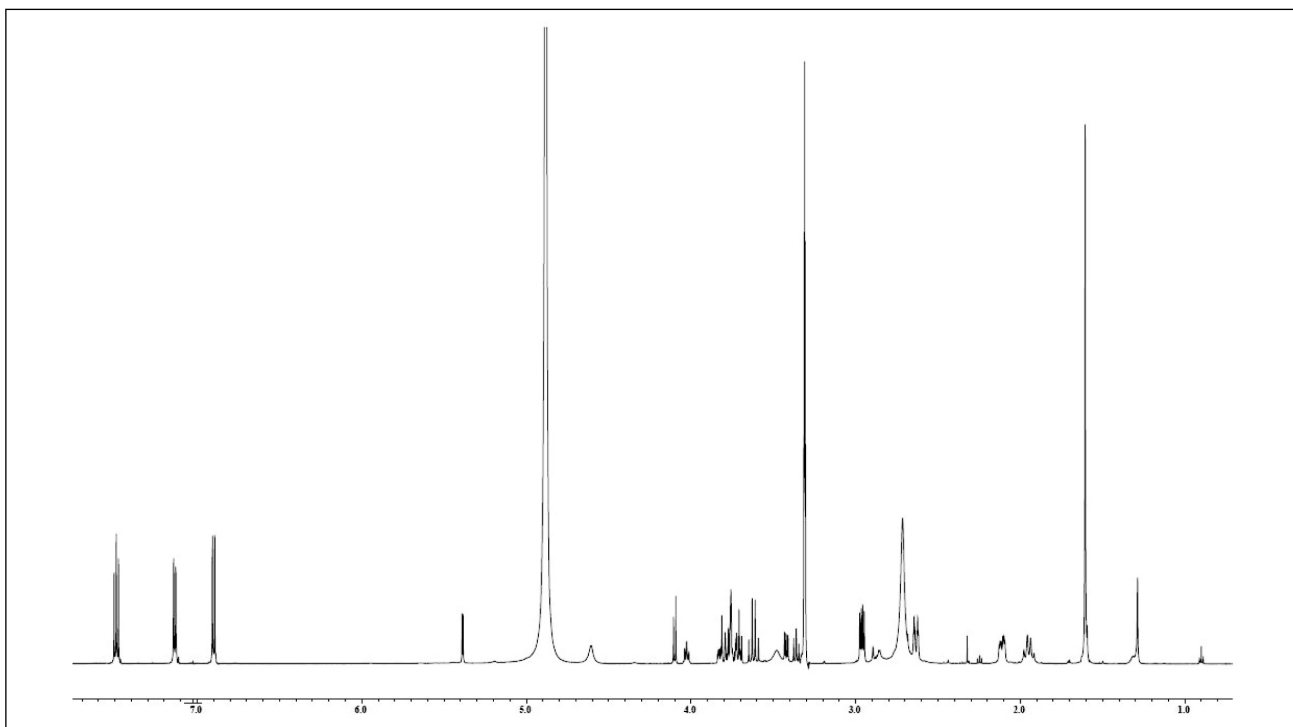


Рис. 2. Спектр ЯМР ^1H препарата Тетрациклин в CD $_3$ OD.

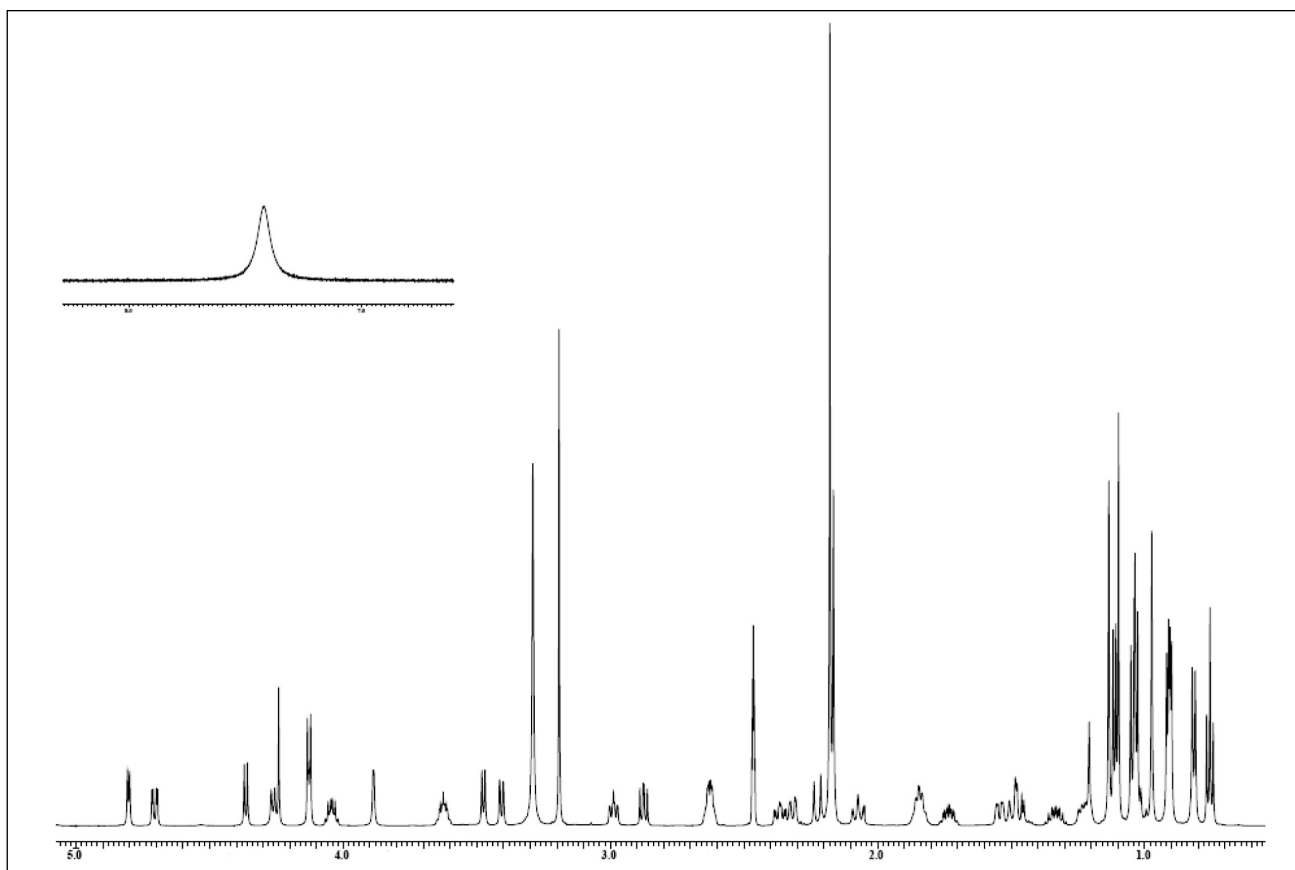


Рис. 3. Спектр ЯМР ^1H препарата Азитромицин в DMSO-d_6 (отдельно представлен сигнал протона гидроксильной группы в положении 6).

лина составило 101,9 и 102,4 мг, что соответствует заявленному производителем содержанию 100 мг с погрешностью менее 3%.

В масс-спектре DART образца содержатся интенсивные сигналы с m/z 445 и m/z 889, соответствующие протонированным молекулам тетрациклина и его протонированному димеру, подтверждающие наличие заявленного компонента ЛС в образце.

Основной сигнал в масс-спектре DART азитромицина соответствует ионам $[\text{M}+\text{H}]^+$, пригодным для установления элементного состава активного вещества.

Спектр ЯМР ^1H Азитромицина, полученный в условиях количественного эксперимента в DMSO-d_6 , представлен на рис. 3.

Спектр препарата содержит следующие сигналы (DMSO-d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0,76 (3H, т, $J = 7,5$ Гц, H-15); 0,82 (3H, д, $J = 7,0$ Гц, H-19); 0,90 (3H, д, $J = 6,7$ Гц, H-21); 0,91 (3H, д, $J = 7,5$ Гц, H-17); 0,97 (3H, с, H-22); 1,01-1,06 (6H, м, H-4'R, H-6', H-16); 1,09 (3H, с, H-7''); 1,11 (3H, д, $J = 6,3$ Гц, H-6''); 1,13 (3H, с, H-18); 1,21 (1H, м, H-7S); 1,33 (1H, м, H-14R); 1,40-1,52 (2H, м, H-7R, H-2'S); 1,53 (1H, м, H-4'S); 1,73 (1H, м, H-14S); 1,84 (2H, м, H-4, H-8); 2,07 (1H, т, $J = 11,5$ Гц, H-9R); 2,17 (3H, с, H-20); 2,18 (6H, с, H-7', H-8'); 2,22 (1H, д,

$J = 14,7$ Гц, H-2'R); 2,28-2,40 (2H, м, H-9S, H-3'); 2,59-2,65 (2H, м, H-10, H-2); 2,87 (1H, дд, $J = 9,3$ Гц, $J = 7,3$ Гц, H-4''); 2,99 (1H, дт, $J = 8,4$ Гц, $J = 1,9$ Гц, H-2'); 3,19 (3H, с, H-8''); 3,41 (1H, д, $J = 8,3$ Гц, H-11); 3,47 (1H, д, $J = 7,2$ Гц, H-5); 3,62 (1H, м, H-5'); 3,88 (1H, с, 2'-ОН); 4,04 (1H, м, H-5''); 4,13 (1H, м, 4''-ОН); 4,24 (1H, с, 12-ОН); 4,26 (2H, м, 11-ОН, H-3); 4,37 (1H, д, $J = 7,0$ Гц, H-1'); 4,70 (1H, дд, $J = 9,9$ Гц, $J = 2,5$ Гц, H-13); 4,81 (1H, д, $J = 5,0$ Гц, H-1''); 7,42 (1H, уш.с., 6-ОН).

Представленный спектр полностью соответствует структурной формуле. Расхождения значений химических сдвигов с таковыми, известными из литературы [7], не превышают 0,03 м.д.

Выполнено 5 независимых измерений образцов азитромицина с вариацией концентраций от 5 до 50 мг/мл. Разница в полученных результатах в данном диапазоне не превышает 3%. Средняя масса азитромицина в таблетке составила 252 мг, тогда как в спецификации указано 250 мг.

Масс-спектр DART препарата Тиенам содержит сигналы ионов состава $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 300 и m/z 359, соответствующие протонированным молекулам имипенема и циластатина, что подтверждает наличие искоемых соединений в представленном на анализ образце.

Спектр ЯМР ^1H препарата Тиенам, полученный в условиях количественного эксперимента в растворе D_2O , представлен на рис. 4.

Большинство сигналов протонов каждой из двух компонент ЛС хорошо разрешены в спектре в области от 0 до 8 м. д. Сигнал остаточных протонов растворителя D_2O , т. е. молекул HDO — интенсивный синглет около 4,78 м. д. Отнесение всех сигналов Имипенема выполнено на основе 1D и 2D ^1H спектров ЯМР и верифицировано с использованием известных для растворителя D_2O литературных данных [8]. Характеристичность химических сдвигов отдельных сигналов Циластатина в спектре ЯМР ^1H и получение для него корреляционных 2D спектров ЯМР COSY позволили без привлечения литературных данных или расчёта спектра сделать полное отнесение сигналов всех протонов, кроме участвующих в протонном обмене с атомами водорода растворителя D_2O . Выявление последних не является необходимым для подтверждения подлинности и количественного определения этой компоненты, а их обнаружение легко реализуется путём добавления к растворителю D_2O анализируемого образца небольшого количества (5–10%) H_2O . Спектр, полученный в таких условиях, полностью соответствует представленным структурным формулам.

Значения химических сдвигов, интенсивности сигналов, мультиплетности и констант спин-спинового взаимодействия в спектре ЯМР ^1H циластатина и имипенема следующие: циластатин: 0,86 (1H, dd, $J=4,7$ Гц, $J=8,0$ Гц, C_{13}H); 1,01 м. д. (1H, t, $J=5,1$ Гц, C_{13}H); 1,14 м. д. (3H, s, C_{15}H_3); 1,19

м. д. (3H, s, C_{16}H_3); 1,58–1,49 м. д. (2H, m, C_5H_2); 1,67–1,58 м. д. (2H, m, C_6H_2); 1,69 м. д. (1H, dd, $J=5,5$ Гц, $J=8,0$ Гц, C_{12}H); 2,16–2,06 м. д. (2H, m, C_4H_2); 2,67–2,57 м. д. (2H, m, C_7H_2); 2,95–3,29 м. д. (2H, m, C_{11}H_2); 3,89 м. д. (1H, dd, $J=4,1$ Гц, $J=7,7$ Гц, C_9H); 6,46 м. д. (1H, t, $J=7,5$ Гц, C_3H). Имипенем: 1,30 м. д. (3H, d, $J=6,5$ Гц, C_9H_3); 2,95–3,29 м. д. (4H, m, C_4H_2 , C_{11}H); 3,41 м. д. (1H, td, $J=2,6$ Гц, $J=6,1$ Гц, C_6H); 3,68–3,54 м. д. (2H, m, C_{12}H); 4,27–4,18 м. д. (2H, m, C_5H , C_8H); 7,84 м. д.; 7,82 м. д. (1H, 2s, изомерные $\text{HC}_{13}=\text{NH}$).

Сигналы двух протонов циластатина в положении 11 и сигналы четырёх протонов имипенема в положениях 4 и 11 в области 2,95–3,29 м. д. перекрываются друг с другом, их отнесение сделано на основании спектра COSY.

Для отдельных протонов циластатина рядом с основными обнаружены минорные сигналы, свидетельствующие об изомерии по связи C_2-C_3 . Содержание изомеров 9:1. Вследствие таутомерного равновесия сигнал фрагмента $-\text{NH}-\text{CH}=\text{NH}$ имипенема проявляется в виде двух синглетов с отношением 2:3 при 7,82 и 7,84 м. д., соответственно.

Проанализировано три образца препарата из трёх различных ампул с указанным содержанием компонентов 500 мг имипенема и 500 мг циластатина. Найдено, что содержание имипенема составило 512 ± 14 мг, что соответствует заявленному содержанию, тогда как найденное содержание циластатина 375 ± 11 мг ниже заявленного на 25%, что может быть объяснено его недовложением, что требует независимой перепроверки по фармако-

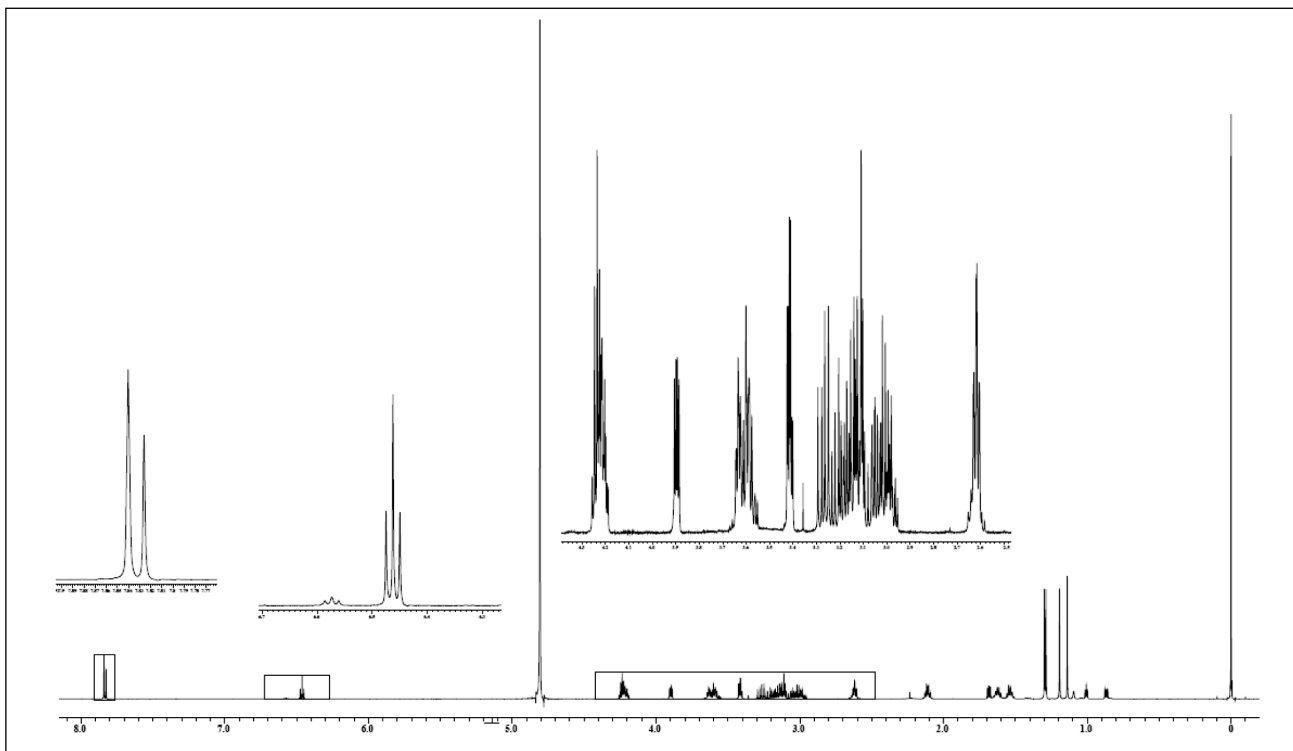


Рис. 4. Спектр ЯМР ^1H препарата Тиенам в D_2O .

пейной методике с использованием стандартных образцов. Неполная растворимость циластатина в анализируемых растворах исключена, т.к. используемые концентрации были ниже, чем рекомендованные для инъекционного раствора 5 мг/мл.

Примесям в препарате соответствуют узкие синглеты при 3,36 и 2,24 м.д., имеющие интегральные интенсивности 0,03 и 0,15 (взяв за 1,00 интенсивность одного протона имипенема). Второй из них, по-видимому, обусловлен остаточным растворителем (CH₃)₂CO, имеющим характеристичный сигнал с таким химическим сдвигом.

Основной сигнал в масс-спектре DART левофлоксацина соответствовал ионам состава [M+H]⁺.

Спектр ЯМР ¹H левофлоксацина, полученный в условиях количественного эксперимента в CDCl₃, представлен на рис. 5. Он содержит следующие сигналы (CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 1,58 (3H, д, J = 7,0 Гц, C₃H—CH₃); 2,34 (3H, с, N—CH₃); 2,46—2,58 (4H, м, H-13', H-14'); 3,30—3,44 (4H, м, H-11', H-12'); 4,34 (1H, д, J = 11,1 Гц, H-2); 4,43 (1H, д, J = 11,1 Гц, H-2); 4,52—4,59 (1H, м, 3-H); 7,63 (1H, д, J = 12,3 Гц, H-8); 8,62 (1H, с, H-5); 15,03 (1H, уш.с., COOH).

Представленный спектр полностью соответствует структурной формуле. Расхождения значений химических сдвигов с таковыми, известными из литературы [9], не превышают 0,03 м. д.

Результаты измерений методом КС ЯМР ¹H верифицированы с помощью количественной спектроскопии ЯМР ¹⁹F. Для этого в раствор препарата левофлоксацина добавили точно измеренное количество трифторуксусной кислоты. Регистрировали

количественный спектр ЯМР ¹⁹F при следующих условиях: импульс 45°, задержка между импульсами 20 с, 16 накоплений, развертка 100 м.д. с установкой несущей частоты -100,0 м.д., 64 К точек на спектр. Спектр содержит синглет трифторуксусной кислоты при -76,5 м.д. и дублет атома фтора левофлоксацина при -120,1 м.д. (J = 12,3 Гц). Расчёт содержания левофлоксацина проводили по формуле, приведённой выше. Расхождение независимых результатов ЯМР ¹H и ЯМР ¹⁹F не превышают 2% и составляют 498,7 мг и 503,4 мг, соответственно, при заявленном содержании 500 мг.

Заключение

На примере нескольких популярных антибиотиков показано, что сочетание двух независимых и комплементарных методов — десорбционной масс-спектрометрии DART и количественной спектроскопии ЯМР ¹H возможно осуществлять быстрый скрининг подлинности и определения содержания фармацевтических субстанций без использования аттестованных стандартных образцов. Важнейшим этапом жизненного цикла лекарственных средств, сопровождение которых целесообразно осуществлять с использованием такой методологии, является этап оптово-розничного обращения, на котором, с одной стороны, использование фармакопейных методов контроля подлинности и качества затруднено отсутствием стандартных образцов, а с другой, наиболее вероятно выявление фальсифицированных или низкокачественных (из-за условий, сроков хранения, или иных причин) лекарственных средств.

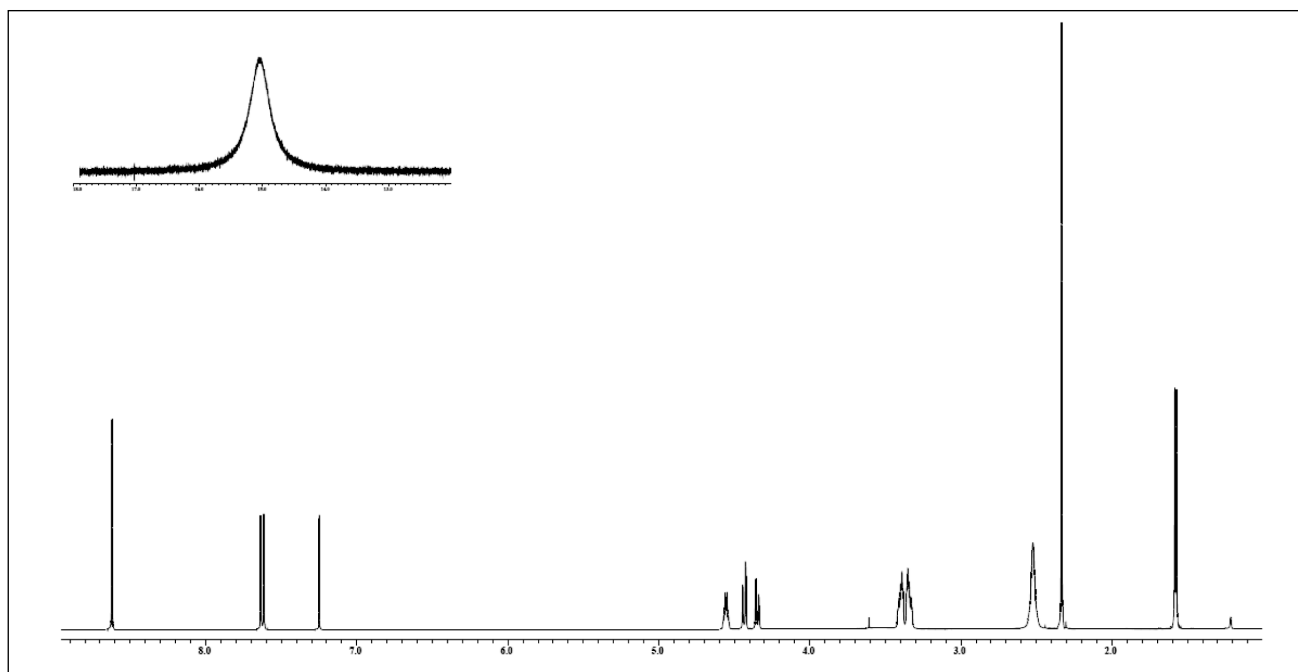


Рис. 5. Спектр ЯМР ¹H препарата Левофлоксацин в CDCl₃ (отдельно вынесен сигнал протона карбоксильной группы).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jancke H. NMR Spectroscopy as a Primary Analytical Method, Document 98/02 to the 4th Session of the CCQM, Sèvres 1998.
2. Holzgrabe Ulrike. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 2010; 57: 229—240.
3. van Duynhoven J., van Velzen E., Jacobs D. M. Quantification of Complex Mixtures by NMR. Ann Reports NMR Spectroscop 2013; 80: 181—236.
4. Калабин Г.А., Горяинов С.В., Ивлев В.А., Нифтуллаев Ф.Ю., Абрамович Р.А. Идентификация и количественное определение лекарственных субстанций в суппозиториях комбинацией методов спектроскопии ЯМР ¹H и десорбционной масс-спектрометрии. Известия Академии наук. Серия химическая. 2014; 8: 1848—1855. / Kalabin G.A., Gorjainov S.V., Ivlev V.A., Niftullaev F.Ju., Abramovich R.A. Identifikacija i kolichestvennoe opredelenie lekarstvennyh substancij v suppozitorijah kombinaciej metodov spektroskopii JaMR ¹H i desorbcionnoj mass-spektrometrii. Izvestija Akademii nauk. Serija himicheskaja. 2014; 8: 1848—1855. [in Russian]
5. Ивлев В.А., Обидченко Ю.А., Прокопьев А.С., Абрамович Р.А., Горяинов С.В., Калабин Г.А. Идентификация и контроль качества синтетических олигопептидных фармпрепаратов методом количественной спектроскопии ЯМР ¹H и масс-спектрометрии. Биофарм журн 2015; 7: 3: 36—44. / Ivlev V.A., Obidchenko Ju.A., Prokop'ev A.S., Abramovich R.A., Gorjainov S.V., Kalabin G.A. Identifikacija i kontrol' kachestva sinteticheskikh oligopeptidnyh farmpreparatov metodom kolichestvenno j spektroskopii JaMR ¹H i mass-spektrometrii. Biofarm zhurn 2015; 7: 3: 36—44. [in Russian]
6. Othersen O. G., Waibel R., Lanig H., Gmeiner P., Clark T.. SCRF-DFT and NMR Comparition of Tetracyclines and 5a,6-Anhydrotetracycline in Solution. J Phys Chem B 2006; 110: 24766—24774.
7. Richard J. Brennan and Jill Barber. Full Assignments of the ¹³C and ¹H NMR Spectra of Azithromycin in Buffered D2O and DMSO-d₆. Magnetic resonance in chem 1992; 30: 327—333.
8. Klaus Florey. Profiles of Drug Substances, Exc Relat Methodol 1988; 17.
9. Salem A. A., Mossa H.A., Barsoum B.N. Quantitative determination of levofloxacin and rifampicin in pharmaceutical and urine samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Spectrochim Acta Part A. 2005; 62: 466—472.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Прокопьев Александр Сергеевич — соискатель кафедры системной экологии экологического факультета РУДН, Москва

Ивлев Василий Александрович — инженер ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

Васильев Василий Геннадиевич — зам. директора центра ПРИМА ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

Горяинов Сергей Владимирович — зав. лабораторией масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии ЯМР ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

Абрамович Римма Александровна — д. фарм. н., доцент, директор ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

Калабин Геннадий Александрович — д. х. н., профессор, директор центра ПРИМА ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

Морфогенез, программируемая клеточная смерть и антибиотикобразование у стрептомицетов в условиях погруженного роста

К. А. ВИНОГРАДОВА¹, *С. Н. ФИЛИПОВА², [А. Н. ПОЛИН]¹

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

² Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Morphogenesis, Programmed Cell Death and Antibiotic Formation in Streptomycetes Under Conditions of Submerged Growth

K. A. VINOGRADOVA¹, S. N. FILIPOVA², [A. N. POLIN]¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow

² Vinogradsky Institute of Microbiology, Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

Стрептомицеты — мицелиальные организмы, которые проходят сложный жизненный цикл, сближающий их с многоклеточными организмами. Стрептомицеты, важные в биотехнологическом отношении объекты, являются продуцентами многих препаратов медицинского назначения, включая большое количество клинически значимых антибиотиков. В настоящем обзоре мы рассматриваем особенности морфогенеза стрептомицетов в погруженных условиях роста в связи с биосинтезом антибиотиков, а также событиями программируемой клеточной смерти (ПКС) — в ходе развития продуцента.

Ключевые слова: стрептомицеты, морфогенез в погруженной культуре, программируемая клеточная смерть, антибиотиков.

Members of the genus *Streptomyces* are mycelial bacteria that undergo a complex life cycle that makes them similar to multicellular organisms. Streptomycetes are important industrial microorganisms, as they produce a plethora of medically relevant natural products, including the majority of clinically important antibiotics. This review addresses the morphogenesis of streptomycetes in submerged growth conditions in connection with the biosynthesis of antibiotics, as well as the events of programmed cell death in the course of the producer's development.

Keywords: streptomycetes, morphogenesis in submerged cultures, programmed cell death, antibiotic production.

Мицелиальные бактерии — стрептомицеты — уникальны не только благодаря своему сложному циклу развития, но и благодаря своей исключительной способности продуцировать огромное количество самых разнообразных биологически активных веществ. В качестве продуцентов основного резерва антибиотиков и многих других важнейших соединений медицинского назначения, стрептомицеты являются, как и несколько десятилетий тому назад, наиболее значимыми объектами для фармацевтической промышленности. В силу ряда экстремальных обстоятельств, одним из которых является быстрое распространение патогенных микроорганизмов с множественной антибиотикорезистентностью [1], потребность в новых эффективных препаратах в настоящее время такова, что внимание исследователей сосредоточилось на разработке неиспользуемых ранее алго-

ритмов получения желаемых соединений, среди которых и нестандартные подходы к скринингу веществ природного происхождения на основе исследований микробного биоразнообразия и экологии продуцентов [2—6], и работа с аннотированными кластерами «спящих» («молчащих») генов вторичного метаболизма, и новые приёмы оптимизации промышленного получения препаратов на основе новых фундаментальных знаний о морфогенезе стрептомицетов [7, 8].

Сложный цикл развития и дифференцировки стрептомицетов обеспечивается согласованной работой молекулярных и генетических механизмов [9, 10]. Производителю, использующему биосинтетический потенциал стрептомицетов, приходится считаться при производстве желаемых веществ с такими условиями, как дисперсность роста продуцентов (ввиду его мицелиального характера), относительно большая длительность процесса синтеза продукта, гетерогенность культуры продуцента и др. факторами, которые осложняют промышленное получение конечного

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: E-mail:svfilipova@mail.ru.

продукта. Однако экспрессия биосинтеза вторичных метаболитов, продуцируемых стрептомицетами, в культурах других организмов, обладающих более «удобными» технологическими показателями, не оказалась успешной, и одной из причин этого является сложная структура биосинтетического аппарата стрептомицетов-продуцентов [7]. Индивидуальный подбор условий культивирования для отдельного продуцента пока остается наиболее распространённым и эффективным биотехнологическим приёмом. Понимание морфогенеза стрептомицетов, знание того, как морфология коррелирует с биосинтезом антибиотиков и/или других вторичных метаболитов, помимо ценности как фундаментального знания, имеет и практическое применение при рационализации промышленного получения практически важных продуктов. В частности, новейшие исследования событий и механизмов программируемой клеточной смерти стрептомицетов как одного из ключевых событий их морфогенеза могут быть использованы как инструмент при оптимизации биосинтеза практически ценных метаболитов.

В настоящем сообщении мы рассматриваем особенности морфогенеза стрептомицетов в связи с синтезом антибиотиков при росте их на жидких средах, а также события программируемой клеточной смерти (ПКС) — в ходе развития продуцента в погруженных условиях роста.

Особенности морфогенеза стрептомицетов в погруженных условиях роста

Промышленные ферментации с использованием стрептомицетов как продуцентов, как правило, осуществляются в условиях погруженного роста продуцента, в жидких средах. Анализ процессов ферментации и их оптимизация в основном фокусируются на таких параметрах, как характер мицелиального роста, динамика биосинтеза продукта, образование разного рода включений в клетках, динамика потребления компонентов питательной среды, pH, аэрация, температура, скорость перемешивания и др.

Линейный рост и ветвление гиф. Классическая схема жизненного цикла стрептомицетов описывает в качестве начала развития стрептомицетов — процесс прорастания спор [8, 11]. Трубки прорастания, а затем и молодые вегетативные гифы, растут путём удлинения в апикальной области, подчиняясь линейному закону роста, присущему стрептомицетам как мицелиальным организмам [12]. Линейный характер роста резко отличает стрептомицеты от одноклеточных бактерий [9]. С появлением новых точек роста, дающих начало новым гифам-ветвям, которые также растут в соответствии с законом ли-

нейного роста, — начинается ветвление гиф. На примере модельной культуры *Streptomyces olivocinereus* — продуцента антибиотика гелиомицина, показано, что рост продуцента на жидких средах идет по экспоненте благодаря появлению новых точек роста мицелия [12]. Эта особенность морфогенеза стрептомицетов была охарактеризована следующим образом: «The combination of apical growth and branching ensures exponential growth» [13].

Генетический контроль роста гиф стрептомицетов в погруженной культуре. Апикальный рост, удлинение гиф в апикальной области регулируется сложным комплексом из нескольких белков, обозначенным как — ТИРОС («tip-organizing center») — «центр, организующий верхушку» [7]. Этот сложный мультибелковый комплекс координирует апикальный рост, синтез новой клеточной стенки, репликацию и сегрегацию ДНК, деление гиф. В качестве компонентов ТИРОС описаны следующие белки — DivIVA, который контролирует апикальный рост, белковый элемент цитоскелета — Scy, белки секреторной ТАТ-системы (the twin-arginine transport secretion system), белок SsgA, р-моделирующий клеточную стенку, CslA-белок, синтезирующий экстрацеллюлярный целлюлозоподобный полимер (cellulose synthase-like protein) и белок FilP. ТИРОС взаимодействует с белками ParA и ParB, вовлечёнными в сегрегацию хромосом, и также, возможно, с белками SsgA, SsgB, FtsZ, контролирующими клеточное деление [14]. Внеклеточный целлюлозоподобный полимер, синтезируемый CslA, может формировать дополнительный защитный слой на внешней стороне верхушки гифы [15].

Сверхэкспрессия DivIVA резко изменяет морфологию гиф, приводя, в частности, к их усиленному ветвлению [13]. Показано, что уровень фосфорилирования DivIVA протеинкиназой AfsK значительно увеличивается на этапе «ареста» синтеза клеточной стенки, что приводит к исчезновению этого белка из верхушечной области гифы, способствуя, таким образом, развитию новых боковых ответвлений [16]. Белки Scy и FilP участвуют в тесной взаимосвязи с DivIVA в регуляции апикального клеточного роста [7, 14].

Типы мицелиальных структур. В процессе роста, ветвления и клеточного деления появляется синцитиальный мицелий, с относительно редкими перегородками, состоящий из многоядерных компартментов, и формируется сложная мицелиальная сеть, организующаяся в специфические мицелиальные структуры [8]. В погруженных условиях роста стрептомицеты образуют мицелиальные структуры различного типа, характерные для каждого продуцента — от рыхлых хлопьев, «пучков» до плотных «глыбок», шарообразных пеллет различной величины и плотности и др.

Внеклеточный матрикс. Гифы, составляющие отдельную мицелиальную структуру, удерживаются вместе благодаря наличию внеклеточного матрикса, который обеспечивает целостность всего образования. В его состав входят белки, гиалуроновая кислота, полисахариды и внеклеточная ДНК [7, 17, 18]. В одной из, по-видимому, первых работ, посвящённой открытию внеклеточного матрикса у стрептомицетов, пеллеты *S.coelicolor*, формируемые им в жидкой среде, подпадают под классическое определение микробных биоплёнок [2, 17]. Внеклеточный матрикс составлен фимбриальными структурами, которые представляют собой амилоидные фибриллы так называемых чаплин-белков (chaplin proteins). Другая составляющая его часть — целлюлозоподобный полимер — выполняет роль каркаса, к которому крепятся фимбриальные структуры. Они осуществляют связывание и взаимодействие соседних гиф, результатом чего и является формирование уплотнённых микроколоний — пеллет [18]. Внеклеточный матрикс мицелиальных структур в условиях погруженного роста обуславливает их прочность, ответственен за их морфологию и, в целом, за само их существование. Сделано предположение, что внеклеточная ДНК, которая высвобождается в ходе первого раунда программируемой клеточной смерти (ПКС) мицелия, используется как один из компонентов этого скрепляющего матрикса [7].

Спорообразование стрептомицетов в условиях погруженного роста. При росте на поверхности плотной среды одной из важнейших фаз, завершающих цикл развития, является формирование на субстратном вегетативном мицелии воздушных структур — воздушного мицелия и спор [9]. Имеется относительно небольшое число сообщений о спорообразовании стрептомицетов в условиях погруженного роста, однако способность образовывать споры при росте на жидких средах выявлена примерно у половины изученных стрептомицетов. После первого сообщения в 1947 г. о способности стрептомицетов образовывать споры в условиях глубинного культивирования — это явление затем было описано у разных представителей рода *Streptomyces*. В настоящее время считается, что спорообразование в погруженных условиях роста может иметь место не у всех видов стрептомицетов, причём для некоторых видов — только в определённых условиях культивирования [7]. Так, высокое содержание Ca^{2+} в культуральной жидкости *S.coelicolor* и *S.lividans* индуцировало образование спороподобных структур. Эффект ионов кальция был объяснён снижением фосфатного пула в питательной среде в этих условиях [19, 20]. Выращивание *S.avermitilis* в питательной среде, лимитированной по источнику фосфора, инициировало формирование погруженных спор, устойчивых к

лизоциму и повышенным температурам [21]. В голодающих по фосфору культурах *S.avermitilis* также активируются процессы автолиза части клеток в суспензиях, в то время как в оставшихся интактными участках мицелия начинается цитодифференцировка с образованием глубинных спор [21]. Сопряженность литических процессов с процессами клеточной дифференцировки стрептомицетов в настоящее время не подвергается сомнению. Механизмы указанных процессов подробно рассмотрены в соответствующих обзорах [8, 22].

При анализе процессов образования глубинных спор в лимитированных культурах стрептомицетов нужно учитывать, что влияние основных источников питания в значительной степени определяется их природой и особенностями штаммов. Для ряда стрептомицетов показано, что снижение концентрации глюкозы до 0,2% не оказывало заметного влияния на их спорообразование в глубинных условиях [19, 23]. В случае *S.viridochromogenes* уменьшение количества глюкозы в среде подавляло образование глубинных спор [24]. Источники азотного питания, такие как соли аммония и органический азот обеспечивают высокую скорость роста стрептомицетов в жидкой культуре, но не способствуют спорообразованию [11]. В условиях фосфатного голодания происходит активация генов, контролирующих накопление в клетке белков «отклика» на стрессовое воздействие недостатка фосфора, необходимого для перестройки соответствующих клеточных структур при переходе клетки к дифференцировке [23, 25].

Основное отличие спорующих гиф, выросших в погруженных условиях, от спор воздушных гиф заключается в структуре поверхностного чехла, основу которого составляет так называемый палочковидный (rodlet) слой. Поверхностный чехол воздушных гиф и спор состоит из двух классов белков — родлинов и чаплинов [8]. Чаплин-белки образуют основные строительные блоки чехла, которые, соединяясь с родлин-белками, формируют фибриллярные структуры. Недавно было показано, что чаплин-белки способны формировать ассиметричные фибриллярные двусторонние мембраны, которые имеют гидрофильную — гладкую и гидрофобную — фибриллярную стороны, посредством которых они могут взаимодействовать с жидкой и воздушной средами [26, 27]. Такие структуры необходимы при формировании воздушных гиф на разделе двух сред. Подобные мембранные структуры отсутствуют в спорующих гифах, выращенных в погруженных условиях [7].

Программируемая клеточная смерть стрептомицетов

Типы программируемой клеточной смерти (ПКС) стрептомицетов. К настоящему времени общеизвестная классическая схема жизненного

цикла стрептомицетов [8] дополнена данными о ПКС — как одной из важных фаз их развития. Впервые гибель мицелия стрептомицетов в процессе их жизнедеятельности, которая до того sporadически отмечалась разными исследователями, была охарактеризована в работах нашего века как событие им присущее, закономерное и необходимое для нормального развития [28—31]. В них был представлен качественно новый взгляд на клеточную смерть стрептомицетов как на неотъемлемое событие, встроенное в программу всего цикла дифференцировки, как важнейшее событие, обеспечивающее нормальный ход развития. Термин ПКС используется при описании любой формы активной регулируемой смерти клеток, в которую вовлечены генетически детерминированные молекулярные механизмы, и которая является неотъемлемой частью программы развития организма [32].

Современное состояние исследований, посвящённых событиям ПКС у стрептомицетов, представлено в обзоре [22]. Исторически первыми были отмечены процесс гибели субстратного мицелия при формировании воздушного мицелия и гибели части воздушных гиф в ходе спорообразования на плотных средах (названный «вторым раундом смерти»). Физиологическая роль этих процессов предположительно состоит в создании пула питательных веществ, обеспечивающих дальнейшую дифференциацию, и пула сигнальных соединений, инициирующих морфогенез и антибиотикообразование [8, 11]. Различные типы протеолитических ферментов стрептомицетов и их ингибиторы, их роль в морфологических изменениях в клетке, генетическая детерминация протеолитического каскада и его взаимосвязь с дифференциацией стрептомицетов, также всесторонне обсуждены в указанном обзоре [22].

В течение последнего десятилетия представлен ранее не описанный у стрептомицетов литический процесс, происходящий на самых ранних этапах роста, — это так называемый «первый раунд смерти» ПКС [33—44]. Относительно недавнее открытие первого раунда ПКС стрептомицетов, по-видимому, связано с тем, что эта короткая фаза в цикле развития, обычно не улавливалась исследователями. Массовое прорастание спор сменяется фазой ранней гибели части молодых гиф, в результате чего формируется мицелий, обозначенный авторами как мицелий МІ или «компартиментализированный». Его отличительной особенностью является высокая степень компартиментализации — закономерное чередование мертвых и живых участков на протяжении одной и той же гифы. Дальнейший процесс развития культуры включает и рост, и упорядоченную гибель большинства гиф мицелия МІ, что завершается появлением многоядерного многокле-

точного мицелия, с редкими перегородками, обозначенного как мицелий МІІ [33, 34]. Мицелий МІ не имеет поверхностного гидрофобного слоя клеточной стенки и назван авторами как вегетативный [33, 37, 44, 45]. Мицелий МІІ — авторами рассматривается как единая репродуктивная стадия дифференциации, в ходе которой осуществляется и споруляция, и образование антибиотиков [40, 42, 45]. Авторы описывают развитие мицелия МІІ на плотных средах как проходящее в три стадии: на ранней стадии, без ещё несформированной поверхностной гидрофобной оболочки клеточной стенки — мицелий МІІ назван «традиционным субстратным»; после того, как на нём сформируется поверхностная гидрофобная оболочка — «традиционным воздушным», а на поздней стадии — при спорообразовании — «спорообразующим». Мицелий МІІ морфологически и физиологически отличается от раннего мицелия МІ. Таким образом, по этой концепции, в процессе роста и развития стрептомицетов происходит смена двух разных типов мицелия — раннего, компартиментализированного МІ — многоклеточным МІІ, и переход от одного типа мицелия — к другому обуславливается «первым раундом смерти» [36, 44].

В гифах мицелия МІ у *Streptomyces coelicolor* выявлена высокая субкомпартиментализация: описано закономерное чередование «живых» и «мертвых» участков размером 1 мм на протяжении одной и той же гифы [33]. Клеточные сегменты-компартменты, закономерно чередуясь по ходу одной и той же гифы, разделены «барьерами проницаемости» с диффузионными свойствами мембран. Посредством этих поперечных мембран-перегородок и обеспечивается этот впервые описанный новый тип компартиментализации мицелия стрептомицетов. Их образование не контролируется известным молекулярным механизмом клеточного деления, с ключевым участием белка FtsZ. О наличии мембранной системы в вегетативном мицелии стрептомицетов, образующей в его гифах новый тип перегородок — поперечные мембраны-перегородки — сообщается и другими исследователями [46].

К регулируемой клеточной смерти, по классификации NCCD [32], можно отнести также события «отсроченного лизиса» у стрептомицетов, несущие биохимические признаки апоптоза высших организмов [47]. Предполагается, что его механизмом является ингибирование одной или нескольких протеинкиназ стрептомицета, и, таким образом, ингибиторы СТПК эукариотического типа являются компонентами молекулярного механизма ПКС стрептомицетов [47]. Данное исследование является частью большого цикла инновационных работ группы российских исследователей [48], целью которых является по-

лучение оригинальных препаратов на основе новых подходов к скринингу эффективных лекарственных средств. Биоинформационный и экспериментальный анализ семейства протеинкиназ (ПК) *Streptomyces* показал перспективность их использования в качестве высокопроизводительных тест-систем для направленного поиска ингибиторов протеинкиназ, играющих ключевую роль в развитии опасных заболеваний человека. Биомишенью этих новых препаратов являются белки, участвующие в каскаде различных проявлений ПКС, как у про-, так и эукариотических организмов. С изучением механизмов бактериальной ПКС связаны большие надежды фармакологии — получение новых возможностей разработки новых эффективных лекарственных медицинских препаратов путём активирования отдельных этапов ПКС [47, 48].

ПКС при росте культуры на жидких средах

Важным тезисом предложенной новой концепции развития стрептомицетов является тезис о полной аналогии их дифференциации при росте на плотных средах и в условиях погруженной культуры, на жидких средах [36, 40, 42, 44]. Те стадии развития стрептомицетов, которые были выявлены на плотных средах, наблюдаются и в условиях погруженного роста. Это утверждение экспериментально подтверждено на модельной культуре *S.coelicolor* A3(2): на ранних стадиях погруженного роста (около 8 ч для данной культуры) в формирующихся пеллетах микроскопически определяется только компартментализированный мицелий МI [36]. Пеллеты увеличиваются в диаметре, в центре их происходит гибель гиф, происходит временная остановка роста культуры (25—48 ч), которую авторы объясняют тем, что происходит процесс ПКС. Таким образом, как результат первого раунда ПКС размер пеллет уменьшается, и активный рост гиф внутри и на периферии пеллет возобновляется примерно к 50-му часу. Вновь образующийся мицелий микроскопически определяется как мицелий МII — синцитиальный, с редкими перегородками [36]. В поздней точке роста (90 ч) определяется только мицелий МII. При увеличении плотности посевного материала (суспензия спор) укорачивается процесс развития и уменьшается размер пеллет. Кривая роста содержит две фазы экспоненциального роста, разделённые фазой временной остановки роста, (что показано и для других стрептомицетов), причём первая волна описывает формирование мицелия МI, а вторая — мицелия МII, а временная остановка роста между ними — соответствует фазе ПКС — гибели мицелия МI.

На поперечных срезах пеллет *Streptomyces tendae* (диаметром 120 мкм) наблюдали пустоты, при-

чиной образования которых вероятно и служат описанные события ПКС внутри пеллет. Предполагается, что в результате ПКС происходит высвобождение специфических соединений — активаторов вторичного метаболизма, которые способствуют продукции нуклеотид пептидного антибиотика никкомицина [7]. Эти экспериментальные наблюдения хорошо коррелируют с описанием событий «первого раунда» ПКС у *S.coelicolor* A3(2), и само наличие пустот в центре пеллет стрептомицетов также связывается с процессом ПКС [36, 38].

Мицелий МII культуры *S.coelicolor* в условиях погруженного роста не формирует поверхностную гидрофобную оболочку. Один из характерных маркеров ПКС — активация специфических нуклеаз, вовлечённых в разрушение хромосомальной ДНК, при развитии *S.coelicolor* в условиях погруженного роста в лабораторном биореакторе — описан [44].

В модельных ферментациях *S.coelicolor* изучали дифференциацию продуцента и образование антибиотиков актинородина и ундецилпродигозина — в колбах на 100 мл [36, 45] и в лабораторных биореакторах объёмом 2 л [44]. Показано, что биофизические параметры ферментационного процесса, такие как парциальное давление растворённого кислорода и скорость поглощения кислорода хорошо коррелировали с различными стадиями дифференциации мицелия *S.coelicolor* при культивировании в биореакторе. Было установлено, что потребность в кислороде была наибольшей на стадии образования первичного мицелия (МI) — стадии интенсивного дыхания и роста гиф. С наступлением стадии отмирания гиф первичного мицелия (ПКС) этот показатель снижался и не восстанавливался до прежнего значения во время формирования мицелия МII. Авторы объясняют это частичным разрушением мицелиальных группировок стрептомицета. Отмечено существование двух максимумов поглощения кислорода в течение ферментации, которые совпадали с двумя стадиями дифференциации мицелия. Снижение этого показателя приходилось на стадию ПКС и литические процессы. Процессы фрагментации и последующий лизис гиф в центральной части пеллет гиф могут быть результатом активации регуляторного белка SsgA. Было показано, что избыточный дезинтеграционный процесс в центральной части пеллет приводил к прекращению антибиотикообразования и активации образования глубинных спор *S.coelicolor* [44]. Основными путями оптимизации биосинтеза вторичных метаболитов стрептомицетов в промышленных условиях, по мнению авторов, являются: пролонгация стадии продуктивного, многоядерного мицелия (МII) и предотвращение спорообразования. Отметим, что аналогичные рекомендации были сделаны ещё А. А. Прокофье-

вой—Бельговской в 1963 г. [11] на основании цитологического контроля исследованных ею продуцентов антибиотиков. При этом подчёркивалось, что управление фазами развития стрептомицетов-продуцентов, их переходами и продолжительностью с целью повышения эффективности биосинтеза возможно осуществлять за счёт регуляции состава питательной среды с учётом динамики изменения компонентного состава культуральной жидкости и дифференцированной потребности культуры актиномицета в основных источниках питания на разных стадиях развития [11].

В рамках предложенной концепции развития стрептомицетов [36, 42, 44, 49] авторы считают, что есть прямая корреляция между переходом от стадии мицелия МI — к стадии мицелия МII и началом вторичного метаболизма — «strict correlation of MI/MII transition with the onset of secondary metabolism» [49]. Подчеркивается, что именно мицелий МII, в отличие от мицелия МI, является продуктивным мицелием, в ходе его развития формируется готовность биосинтетического аппарата к образованию вторичных метаболитов. Нормальное течение и завершение событий ПКС, обеспечивая формирование мицелия МII, являются надёжным показателем «готовности» культуры к образованию вторичных метаболитов. Исходя из того, в условиях погруженного роста выделение отдельных этапов дифференциации затруднительно и не столь очевидно, как при росте на плотных средах, предлагается рассматривать события первого раунда ПКС как надёжный маркер готовности культуры продуцента к образованию вторичных метаболитов.

Значение процесса ПКС («первого её раунда») для нормального хода дифференциации стрептомицетов наглядно было показано в работе с двумя делеционными мутантами *S. natalensis* — $\Delta katA1$ и $\Delta catR$ по генам, вовлечённым в ответ на окислительный стресс (*katA1* и *catR*). Мутанты характеризовались изменённым ответом на окислительный стресс: у $\Delta katA1$ — ослабленный ответ (делеция гена *katA1*, контролирующего экспрессию монофункциональной каталазы *KatA1*), у $\Delta catR$ — усиленный ответ (увеличение суммарной каталазной активности — в результате дерепрессии гена *katA1*). Стадия ПКС была полностью подавлена у $\Delta katA$, а у $\Delta catR$ наблюдалось её значительное торможение, и оказалось, что полная блокировка ПКС, или задержка этого процесса приводит к резкой дезорганизации типичного строения колонии, активации процессов первичного метаболизма, повышению степени пролиферативной активности мицелия [50].

Исследователям процессов биосинтеза антибиотиков хорошо известно, что к биосинтезу многие продуценты приступают после снижения скорости роста. В той фазе развития, когда ско-

рость накопления биомассы резко падает, происходят значительные изменения в морфологическом и физиологическом состоянии продуцента. Протеолиз субстратного мицелия, инициированный истощением источников питания в среде, играет фундаментальную роль в морфогенезе стрептомицетов. В жидкой культуре остановка роста сопровождается активацией генов биосинтеза антибиотиков, генов антибиотикорезистентности, стимулов стресс-ответа, остановкой синтеза рибосомальных белков [51].

Концепция двухфазного развития бактериальных культур в условиях погруженного роста впервые была сформулирована В. Н. Шапошниковым [52] для процесса ацетоно-бутилового брожения, и многократно затем подтверждена в экспериментальных работах с продуцентами антибиотиков [53]. Современные исследования ПКС как закономерного события в развитии стрептомицетов раскрывают молекулярные и генетические основы давно замеченной корреляции определённых событий: истощения питательных ресурсов в окружающей среде и инициированных этим истощением литических процессов в субстратном мицелии, которые, в свою очередь, создают энергетические и питательные ресурсы для следующего важнейшего этапа жизнедеятельности — формирования воздушных репродуктивных структур и биосинтеза антибиотиков [8, 22]. Глобальные перестройки в экспрессии генов, происходящие в фазе перехода к формированию воздушного мицелия и спор, связаны с накоплением в условиях истощения питательных веществ низкомолекулярных соединений — гуанозинтетрафосфата и гуанозинпентафосфата, которые оказывают специфическое регуляторное действие на развитие стрептомицетов [8]. Детали метаболического каскада при истощении питательных веществ в среде, приводящего к инициации спорообразования и начала биосинтеза антибиотика, представлены в обзоре [22].

Описана ключевая роль глобального регулятора дифференциации стрептомицетов — DasR в запуске спорообразования и биосинтеза антибиотика с участием N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) клеточной стенки, образующегося в ходе ПКС при гибели мицелия [8, 22, 54]. Дуалистический характер сигналинга N-ацетилглюкозамином связывает события, происходящие в условиях избытка или, напротив, нехватки питательных веществ в окружающей среде, с принципиальной жизненной стратегией стрептомицетов — пребывать в состоянии активного роста или немедленно приступить к завершающей стадии развития — спорообразованию [54].

Есть экспериментальные доказательства прямой связи ПКС с началом биосинтеза антибиотика: показано, что в условиях минимальной среды

с низким содержанием источника углерода при добавлении GlcNAc (который появляется в среде, когда разрушается клеточная стенка продуцента, претерпевающего ПКС) происходит активация экспрессии кластера «молчащих или криптических» генов биосинтеза антибиотика коелимицина P1. Высказана идея, что в процессе ПКС возможна активация спящих биосинтетических путей, в том числе, активация кластеров спящих генов других антибиотиков [8]. Возможно, что будет разработан алгоритм, позволяющий активировать ранее аннотированные молчащие гены биосинтеза новых вторичных метаболитов, основанный на инициации процессов программируемой смерти стрептомицетов.

Влияние морфологии погруженной культуры продуцента на уровень биосинтеза антибиотика

Размер и форма образуемых мицелиальных группировок во многом определяются условиями ферментации, а также генетическими особенностями продуцента и носят видоспецифический и, даже, штаммоспецифический характер.

Давно согласованный взгляд на морфогенез состоит в том, что характер образовавшихся мицелиальных образований зависит не только от генетических особенностей вида или штамма продуцента, но и то, что морфология подвержена также сильному влиянию условий культивирования и физико-биотехнологических параметров ферментации (компоненты питательной среды, в частности, характер и концентрация источника азота, углерода и фосфора, наличие микроэлементов, значение pH — начальное и в ходе ферментации, характер и количество внесённого посевного материала, объём биореактора и интенсивность перемешивания, скорость подачи кислорода, вязкость среды, пеногасители и др.). Например, при увеличении плотности посевного материала (суспензия спор) укорачивается время развития культуры продуцента и уменьшается размер пеллет.

Тип мицелиальных группировок индивидуального продуцента считается важным показателем для оценки его биосинтетической активности при проведении процесса ферментации, и отмечено наличие определённой зависимости между морфологией продуцента и уровнем антибиотикообразования. Однако нет однозначной, единообразной для всех продуцентов зависимости между размерами и типом мицелиальных образований, количеством накопленной биомассы, с одной стороны, и уровнем биосинтеза антибиотика, с другой стороны. Эта зависимость не является прямолинейной, и зависит и от вида (или штамма) продуцента, и от комплекса условий культивирования продуцента.

Гетерогенность культуры продуцента. Растущая на жидких средах культура стрептомицета-продуцента характеризуется определённой морфологической гетерогенностью. Эта особенность давно отмечена при лабораторном или промышленном культивировании продуцентов. Одной из причин может являться несинхронное прорастание спор (если посевным материалом является споровая суспензия) [7]. С другой стороны, морфологическая гетерогенность присуща стрептомицетам, и она будет иметь место даже при использовании в качестве посевного материала высокосинхронизированной культуры спор, так как обусловлена особенностями их строения и развития [7]. Вегетативный мицелий стрептомицетов является синцитиальным — он образован компартментами, которые содержат многие копии хромосом, одноядерные споры в массе также содержат разный генетический материал [8].

Давно отмечено, что каждый вид стрептомицетов представлен несколькими морфологическими типами колоний (вариантами), которые различаются присущей только данному варианту способностью достичь определённого уровня развития (в релевантных условиях роста). Разные типы колоний различаются сложностью своей дифференциации: формирование характерного профиля колоний, степень развития воздушного мицелия, наличие и интенсивность спорообразования, синтез характерных пигментов и т.д. На основе большого массива экспериментального материала по изучению структуры популяций актиномицетов-продуцентов антибиотиков на искусственных питательных средах было выдвинуто положение о существовании определённой закономерности в популяционной изменчивости актиномицетов. Было показано, что в «кажущемся на первый взгляд неупорядоченном разнообразии вариантов (типов колоний) чётко обнаруживаются общие по ориентирным морфолого-культуральным признакам черты их сходства, позволяющие классифицировать варианты и распределять в параллельные (гомологические) ряды, а также прогнозировать в популяциях ещё не изученных видов такие же ряды вариантов» [55]. В биотехнологической практике отмечено, что способность продуцента к интенсивному образованию антибиотиков коррелирует, как правило, с его способностью к сложной морфологической дифференцировке. Вариант с наибольшей степенью морфологической дифференциации (сложный профиль колонии, обильный воздушный мицелий и интенсивное спорообразование, наличие пигментов, обуславливающих характерную окраску и др.), и, как правило, составляющий основу популяции штамма-продуцента, обладает наиболее высокой способностью к синтезу вторичных метаболитов по сравнению с другими ва-

риантами, что и было многократно продемонстрировано при изучении разных стрептомицетов-продуцентов, и, в частности, это было показано на примере продуцентов антибиотиков гелиомицина, абурамицина, триена [56—59].

Влияние состава питательной среды на морфологию погруженной культуры. Для практических целей, в частности, облегчения методических приёмов определения биомассы продуцента, предпочтительнее дисперсный, а не мицелиальный характер роста продуцента, однако высокий уровень биосинтеза многих антибиотиков наблюдается обычно при росте продуцента в виде пеллет. Образование некоторых антибиотиков и противоопухолевых веществ связано с неотъемлемой их способностью формировать мицелиальные пеллеты.

Характер источника углерода решающим образом влияет на морфологию, скорость роста и накопление биомассы погруженных культур стрептомицетов. Ключевая роль метаболизма источников углерода как для морфологии мицелиальных образований, так и для процесса накопления биомассы и биосинтеза самих антибиотиков многократно показана в исследованиях по изучению биосинтеза антибиотиков, и обобщающим заключением было то, что при разработке условий биосинтеза невозможно дистанцироваться от индивидуального подбора источника углерода (или от сочетания таковых) для каждого определённого продуцента [7]. В обзоре [7] собрано несколько примеров индивидуальной потребности продуцентов в оптимальном источнике углерода для образования антибиотика, а также существующей сложной корреляции между характером источника углерода в среде, накопленной биомассой и размером формирующихся мицелиальных образований — пеллет. При росте *S. akiyoshiensis* на среде с лактозой размер пеллет превышал 600 мкм, при росте на среде с глюкозой размер составлял менее 200 мкм, однако при росте на этих источниках углерода накапливалось в пять раз меньше биомассы, чем на среде с крахмалом [7]. При поиске наиболее благоприятного источника углерода для биосинтеза гелиомицина проведено ранжирование 18 испытанных соединений — по максимально накопленной биомассе, скорости роста продуцента и уровню синтезируемого антибиотика гелиомицина. Отмечены разные группы источников углерода: источники, поддерживающие относительно высокие скорости роста продуцента и высокий уровень образования антибиотика (среди них — глицерин), источники углерода, поддерживающие низкие скорости роста при низком уровне синтеза антибиотика, а также группа соединений, поддерживающих относительно высокие скорости роста и при этом способные обеспечить лишь очень низкий уровень биосинтеза гелиомицина (среди них —

сахароза и L-арабиноза). Первая группа соединений наиболее интересна для оптимизации ферментационных сред [60]. Показано, что L-арабиноза, на среде с которой наблюдается обратное соотношение процессов роста и биосинтеза, контролирует биосинтез гелиомицина по типу углеродной катаболитной репрессии. Она подавляет синтез ферментов, участвующих в катаболизме глицерина, являющегося оптимальным источником для биосинтеза антибиотика [61, 62].

Количество внесенного в среду источника углерода сильно влияет на ветвление вегетативных гиф [63]. При росте продуцента антибиотика гелиомицина *S. olivocinereus* на средах с относительно высоким содержанием глюкозы снижается радиальная скорость роста (линейная скорость удлинения гиф в апикальной области), при этом происходит усиление интенсивности ветвления гиф. В результате эти скоординированные события приводят к формированию более плотных колоний, с большей биомассой, но меньшего радиуса. На средах с низкими концентрациями источника углерода (глюкозы) резко возрастает радиальная скорость *S. olivocinereus*, снижается плотность колонии, но увеличивается её радиус [63]. Высказано предположение, что эта особенность морфогенеза стрептомицетов имеет приспособительный смысл для их выживания в меняющихся условиях окружающей среды. В почве, с её ограниченными в большинстве случаев ресурсами, именно снижение радиальной скорости роста колонии, в сочетании с интенсивным ветвлением гиф, даёт возможность популяции «оставаться» в микроне, обогащённой источниками питания и энергии, для полного освоения имеющихся ресурсов. На бедной среде для жизнеобеспечения популяции большее значение имеет рост гиф в верхушечной области, их радиальное удлинение. Гифы с повышенной скоростью, растущие по радиусу, обеспечивающие радиальный рост и, следовательно, «продвижение» колонии в пространстве, названы «поисковыми» — «searching hyphae» [7].

При культивировании на жидких средах, в условиях перемешивания, подачи кислорода, изменениях вязкости среды, — пеллеты подвергаются механическому воздействию, оказывающему сильное влияние и на саму целостность, и на рост мицелиальных образований продуцента. Дезинтеграция пеллет по механическим причинам может происходить в их периферической области, или пеллеты разрушаются целиком, распадаясь на отдельные фрагменты меньшего размера. При нарушении целостности уже сформировавшихся пеллет возникают и начинают свой рост и формирование новые мицелиальные образования — пеллеты. Так, в культуре появляются новые пеллеты — меньшего размера, что изменяет, усложняет общую картину роста и развития этой культуры и сказывается на

образовании антибиотика. Изучены условия, когда взаимодействие между гифами ослабляется. Среди таковых указываются изменения pH среды, нехватка питательных веществ, кислорода, или образование токсинов в центре пеллет [7].

С другой стороны, в результате ухудшения массообмена или других неблагоприятных факторов в процессе ферментации может происходить укрупнение пеллет, что может приводить к их дальнейшей дезинтеграции и снижению продуктивной способности продуцента. А. А. Прокофьевой-Бельговской [11] были проанализированы возможные причины укрупнения уплотненных шарообразных микроколоний за счёт формирования интенсивно ветвящихся укороченных, утолщенных, иногда искривленных гиф мицелия. Примеры этих сложных взаимоотношений приведены в обзоре [7]: уменьшение диаметра пеллет ниже «критического» (менее 88 мкм) у продуцента эритромицина *S. erythraea* приводит к падению уровня синтезированного антибиотика, тогда как антибиотик авермектин синтезируется пеллетами небольшого размера, и образование антибиотика увеличивается при уменьшении размеров пеллет. Усиленная фрагментация мицелия погруженной культуры у *S. coelicolor* приводит к неспособности этого продуцента синтезировать актинородин, и в то же время усиленная фрагментация мицелия у погруженной культуры *S. venezuelae* не снижает образование хлорамфеникола. У высокопродуктивного штамма *S. noursei* образуются плотные пеллеты, а у дикого штамма — пеллеты имеют рыхлую структуру.

Показано, что критический размер пеллет определяется плотностью мицелиальной массы, концентрацией растворённого кислорода в культуральной жидкости и интенсивностью дыхания гиф мицелия. Увеличение размера пеллет приводит к ограничению доступа кислорода к центру мицелиальных группировок и, в конечном итоге, к их лизису. Плотность пеллет определяется интенсивностью ветвления гиф и частотой формирования поперечных перегородок в гифах, что, в свою очередь, зависит и от вида продуцента, и от условий его культивирования. Увеличение частоты образования перегородок на гифах способствует фрагментации, поскольку именно в местах их формирования клеточная стенка наиболее подвержена разрыву. Частота ветвления в результате образования многочисленных коротких веток увеличивает мицелиальную массу, препятствует росту гиф внутри пеллет, вызывая их искривление, и способствует развитию литических процессов внутри пеллет. Увеличение интервалов между поперечными перегородками способствует формированию более длинных ответвлений, что повышает пористость пеллет, улучшая их массообмен и продуктивность продуцента [46].

Важным фактором биосинтетической активности продуцента является сохранение баланса в обеспечении питательными веществами и кислородом различных зон внутри мицелиальной группировки, что необходимо для поддержания активного роста гиф на периферии и формирования продуктивного мицелия в процессе дифференциации внутри пеллет. Показано, что наибольшей продуктивностью обладают фракции околосверхушечных (субапикальных) и прилегающих к ним, так называемых, «гифальных» участков гиф. Их формирование связано с началом стадии ПКС в центральной части пеллет. На модельной культуре *S. coelicolor* была разработана математическая модель развития пеллет в процессе ферментации, где в числе основных параметров были использованы радиус мицелиальных группировок, концентрация растворённого кислорода, гифальная единица роста (HGU), характеризующая рост и ветвление гиф, доля основных ростовых фракций мицелия (апикальной, субапикальной и «гифальной») в общей биомассе пеллет [46]. Предложенную модель развития мицелиальных группировок авторы рекомендуют использовать в разработках системы контроля ферментаций стрептомицетов.

Как указывалось, с биотехнологической точки зрения предпочтителен рост не в виде пеллет, а более или менее гомогенный рост продуцента. Исследование генетических параметров формирования пеллет показало, что в геноме модельного штамма *S. lividans* 66 есть *mat* locus генов, контролирующий образование пеллет. Мутант *S. lividans* 66 с делецией в этом локусе не образовывал пеллет, характеризовался дисперсным ростом и повышенной продуктивностью. Однако только в некоторых случаях дисперсный рост продуцента коррелирует с повышенным уровнем синтеза антибиотика, и предпочтителен рост в виде пеллет.

Важной проблемой при культивировании мицелиальных продуцентов в погруженных условиях является сама накапливающаяся масса мицелия в жидкой культуре. Она способна сильно изменить вязкость и густоту среды культивирования (её реологические свойства), тем самым ухудшая условия роста и развития самой культуры продуцента [7]. В условиях промышленных ферментаций в биореакторах повышенная вязкость питательного бульона в результате роста и развития мицелиальной массы стрептомицетов-продуцентов инициирует турбулентные потоки культуральной жидкости, которые оказывают травмирующее действие на гифы мицелия. В результате интенсифицируются литические процессы на самом раннем этапе роста, которые могут приводить к распаду гиф первичного, молодого мицелия М1 и дезинтеграции пеллет на ранней стадии развития продуцента.

В отличие от ферментации в колбах [36], примерно после 50 ч ферментации *S.coelicolor* в биореакторе объёмом 2 л наблюдались фрагментация гиф, значительное падение уровня внутриклеточного белка, гибель мицелиальных клеток и дезинтеграция большей части пеллет, что приводило к значительному падению уровня антибиотикообразования [49]. Причины дезинтеграционных процессов мицелиальных группировок в биореакторах пока не имеют чёткого объяснения. Предполагается, что явление массового лизиса гиф может быть вызвано особенностями дифференциации стрептомицетов-продуцентов, гидродинамическими параметрами ферментаций в биореакторе и чувствительностью к ним мицелиальных группировок. Использование пеногасителя в процессе ферментации *S.coelicolor* позволило предотвратить раннюю дезинтеграцию мицелиальных группировок [44]. В результате подбора компонентов питательной среды, а также внесения в питательную среду соединений с антиокислительной активностью удавалось снизить интенсивность литических процессов на ранней стадии развития продуцента эритромицина *Saccharopolyspora erythrae* в условиях промышленного ферментёра и, таким образом, повысить уровень антибиотикообразования [65].

Установлено, что на морфологию пеллет и их целостность оказывает существенное влияние регуляторный белок *HyuS* (hyphae-associated protein). С-терминальная часть этого белка обладает аминоксидазной активностью, которая способствует поддержанию нормальной морфологии пеллет [7]. У *S.lividans* делеция гена *hyuS* приводит к формированию пеллет неправильной формы и менее плотных.

Филогенетический анализ белков *SsgA* и *SsgB* позволил разделить стрептомицеты по характеру роста и развития в жидкой среде на два кластера: первый объединял стрептомицеты, не способные образовывать глубинные споры и формирующие мицелиальные группировки в виде глыбок или комков, во второй — попали стрептомицеты, образующие глубинные споры и плотные пеллеты [7]. Установлено, что сверхэкспрессия *SsgA* активирует процессы формирования перегородок внутри гиф, ветвления гиф и инициирует образование глубинных спор при росте в погруженных условиях. *SsgA* контролирует процессы перестройки клеточной стенки гиф в процессе роста и развития стрептомицетов путём физической модификации пептидогликана. Последнее обстоятельство, как предполагается, делает клетки менее устойчивыми к лизису. Установлено также, что процессы фрагментации гиф в результате экспрессии *SsgA* наиболее активны в стационарной фазе роста и предопределяют события ПКС [7]. Плейотропное действие *SsgA* на

морфологию гиф в конечном итоге оказывает значительное влияние на уровень антибиотикообразования [64, 66].

Перспективы использования особенностей морфогенеза стрептомицетов для оптимизации биосинтеза антибиотиков

Наиболее уязвимые места в системе промышленной ферментации с использованием стрептомицетов в качестве продуцентов связаны с характером роста этих мицелиальных организмов. Достаточно медленный рост, гетерогенность культуры-продуцента, высокая вязкость культуральной жидкости — все эти факторы неблагоприятно сказываются на выходе конечного продукта. Использование в качестве хозяев для гетерологической экспрессии продуктов биосинтеза стрептомицетов клетки с более благоприятными параметрами роста, такие как бациллы или дрожжи, вызывает большие трудности, связанные со сложной организацией биосинтетического аппарата, строго специфичного для стрептомицетов.

Изменения основных биофизических параметров ферментации в биореакторах, например, скорости перемешивания, pH и состава источников питания сказываются на морфологии мицелиального роста продуцента. Изменения ответа на условия ферментации могут происходить на штаммовом уровне и быть связаны с процессами фрагментации и агрегации мицелиальных группировок. В последнее время предпринимаются попытки смоделировать влияние совокупного действия генетических факторов морфогенеза стрептомицетов с условиями культивирования на выход конечного продукта. Так, была предложена компьютерная модель роста гиф стрептомицета и формирование мицелиальных пеллет различной морфологии [63]. В качестве основных параметров этой модели использовались: количество растворённого кислорода, рост и ветвление гиф, их фрагментация, формирование поперечных перегородок. Предложенная модель предусматривала возможность визуализации влияния этих факторов на морфологию пеллет и предоставляла пользователю возможность управления характером роста, однако не учитывала генетические параметры контроля морфогенеза стрептомицетов. Установлено, что основные компоненты Tat-секреторной системы стрептомицетов локализованы непосредственно за верхушечной областью гифы, что предполагает благоприятное воздействие фрагментированного роста, увеличивающего количество апикальных сайтов в гифе, на выход секретированного продукта [66]. В настоящее время большое

внимание уделяется генетическим параметрам микроморфологии стрептомицетов, в то время как параметры формирования мицелиальных группировок не до конца ясны.

Процесс получения промышленных штаммов-продуцентов сопряжен с многочисленными мутациями, направленными на усовершенствование их технологических характеристик. Анализ мутаций позволил бы получить ценную информацию о профилях экспрессии генов нескольких генераций штамма, что дало бы возможность идентифицировать гены, на которых будут сосредоточены новые направления селекции штаммов-продуцентов.

Стрептомицеты — важнейшая в биотехнологическом отношении группа микроорганизмов. 70% препаратов, используемых в настоящее время в медицине, являются продуктами вторичного метаболизма стрептомицетов. Эти организмы характеризуются сложным жизненным циклом, включающем, как отмечала Прокофьева-Бельговская [11] стадии одной клетки, частичного ценоцита и многоклеточного образования. В процессе жизнедеятельности стрептомицетов происходит поэтапное образование мицелия разных

типов, смена которых происходит в результате генетически запрограммированного литического процесса ПКС.

Таким образом, представленные материалы позволяют рассматривать характер преобразования морфологии промышленных штаммов-продуцентов актиномицетов в качестве важнейшего фактора, определяющего особенности их поведения в процессе ферментации и уровень биосинтетической активности. В свою очередь, ход морфологических изменений в процессе глубинного культивирования зависит от генетических особенностей штамма-продуцента, а также биофизических параметров ферментёра, состава питательной среды, которые обуславливают специфичность профиля экспрессии генов. Обусловленность морфологических особенностей роста и развития актиномицетов-продуцентов генетическими факторами и условиями культивирования определяет основные пути оптимизации ферментационных процессов, селекцию штаммов-продуцентов, а также совершенствование скрининговых исследований по поиску новых, практически ценных вторичных метаболитов актиномицетов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 5—6: 38—48. / Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Polin A.N., Kozhevina P.A. Ustoichivost' mikroorganizmov k antibiotikam: rezistoma, ee ob'em, raznoobrazie i razvitie. *Antibiotiki i khimioter* 2013; 58: 5—6: 38—48. [in Russian]
2. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. О биопленках стрептомицетов. I. Распространение и формирование. *Антибиотики и химиотер* 2015; 60: 1—2: 44—55. / Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Polin A.N., Kozhevina P.A. O bioplenkakh streptomycetov. I. Rasprostraneniye i formirovaniye. *Antibiotiki i khimioter* 2015; 60: 1—2: 44—55. [in Russian]
3. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. О биопленках стрептомицетов. II. Биотехнологическое использование. *Антибиотики и химиотер* 2015; 60: 5—6: 27—33. / Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Polin A.N., Kozhevina P.A. O bioplenkakh streptomycetov. II. Biotekhnologicheskoye ispol'zovaniye. *Antibiotiki i khimioter* 2015; 60: 5—6: 27—33. [in Russian]
4. Kolter R., van Wezel G.P. Goodbye to brute force in antibiotic discovery? 2016 Doi 10.1038/nmicrobiol.2015; 20.
5. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Вторичные метаболиты морских микроорганизмов. I. Вторичные метаболиты морских актиномицетов. *Антибиотики и химиотер* 2015; 60: 7—8: 47—59. / Orlova T.I., Bulgakova V.G., Polin A.N. Vtorichnyye metabolity morskikh mikroorganizmov. I. Vtorichnyye metabolity morskikh aktinomycetov. *Antibiotiki i khimioter* 2015; 60: 7—8: 47—59. [in Russian]
6. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Вторичные метаболиты микроорганизмов — потенциальный резерв фармацевтических препаратов. *Антибиотики и химиотер* 2014; 59: 3—4: 38—44. / Orlova T.I., Bulgakova V.G., Polin A.N. Vtorichnyye metabolity mikroorganizmov — potencial'nyy rezerv farmatsevticheskikh preparatov. *Antibiotiki i khimioter* 2014; 59: 3—4: 38—44. [in Russian]
7. Van Dissel D., Claessen D., van Wezel G.P. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv Appl Microbiol* 2014; 89: 1—45.
8. Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016; 80: 1—43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15
9. Flärdh K., Buttner M.J. *Streptomyces morphogeneticus*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 1: 36—49.
10. McCormick, J.R., Flärdh K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36: 1: 206—231.
11. Прокофьева-Бельговская А.А. Строение и развитие актиномицетов. М.: Изд-во АН СССР; 1963.
12. Кожевина Л.С., Виноградова К.А., Кожевин П.А., Силаев А.Б. Изучение связи роста и морфологической дифференциации с антибиотикообразованием у культур — продуцентов гелиомицина. *Антибиотики* 1976; 21: 8: 709—714. / Kozhevina L.S., Vinogradova K.A., Kozhevina P.A., Silaev A.B. Izuchenie svyazi rosta i morfologicheskoy differenciacii s antibiotikoobrazovaniem u kul'tur — producentov geliomicina. *Antibiotiki* 1976; 21: 8: 709—714. [in Russian]
13. Flärdh K., Richards D. M., Hempel A. M., Howard M., Buttner M.J. Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15: 6: 737—743.
14. Holmes N. A., Walshaw J., Leggett R. M., Thibessard A., Dalton K. A., Gillespie M. D. et al. Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: E397—E406.
15. Chater K. F., Biro S., Lee K. J., Palmer T., Schrepf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 2010; 34: 171—198.
16. Hempel A. M., Cantlay S., Molle V., Wang S. B., Naldrett M. J., Parker J. L. et al. The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: E2371—E2379.
17. Kim Y.M., Kim J.H. Formation and dispersion of mycelial pellets of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Microbiol* 2004; 42: 1: 64—67.
18. de Jong W., Wosten H.A.B., Dijkhuizen L., Claessen D. Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* 2009; 73: 6: 1128—1140.
19. Daza A., Martín J. F., Domínguez A., Gil J. A. Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 2483—2491.
20. Glazebrook M. A., Doull J. L., Stutterd C., Vining L. C. Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 581—588.
21. Филиппова С.Н., Горбатюк Е.В., Поглазова М.Н., Соина В.С., В.Д. Кузнецов, Эль-Регистан Г.И. Образование эндоспор *Streptomyces avermitilis* в погруженной культуре. *Микробиология* 2005; 74: 2: 204—214. / Filippova S.N., Gorbatiuk E.V., Poglozova M.N., Soina V.S., V.D. Kuznetsov, El'-Registan G.I. Obrazovanie jendospor *Streptomyces avermitilis* v pogruzhennoj kul'ture. *Mikrobiologiya* 2005; 74: 2: 204—214. [in Russian]
22. Филиппова С.Н., Виноградова К.А. Программируемая клеточная смерть как одна из стадий дифференциации стрептомицетов. *Микробиология* 2017; 86: 4: в печати. / Filippova S.N., Vinogradova K.A. Programmiruemaya kletochnaya smert' kak odna iz stadij differenciacii streptomycetov. *Mikrobiologiya* 2017; 86: 4: v pechati. [in Russian]
23. Kendrick, K. E., & Ensign, J. C. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J Bacteriol* 1983; 155: 357—366.

24. Koepsel R., Ensign J.C. Microcycle sporulation of *Streptomyces viridochromogenes*. Arch Microbiol 1984; Nov; 140: 1: 9–14.
25. Kwak J., McCue L. A., Trzjanska K., Kendrick K. E. Identification and characterization of a developmentally regulated protein, EshA, required for sporogenic hyphal branches in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 2001; 183: 3004–3015.
26. Bokhove M., Claessen D., de Jong W., Dijkhuizen L., Boekema E. J., Oostergetel G. T. Chaplins of *Streptomyces coelicolor* self-assemble into two distinct functional amyloids. J Struct Biol 2013; 184: 301–309.
27. Ekkers D. M., Claessen D., Galli F., Stamhuis E. J. Surface modification using interfacial assembly of the *Streptomyces* chaplin proteins. Appl Microbiol Biotechnol 2014; 98: 4491–4501.
28. Miguélez E.M., Hardisson C., Manzanal M.B. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. J Cell Biol 1999; 145: 3: 515–525.
29. Miguélez E.M., Hardisson C., Manzanal M.B. *Streptomyces*: a new model to study cell death. Internat Microbiol 2000; 3: 3: 153–158.
30. Nicieza R. G., Huergo J., Connolly B. A., Sanchez J. Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation: Analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis. J Biol Chem. 1999; 274: 29: 20366–20375.
31. Fernández M., Sánchez J. Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. Microbiology 2002; 148: 2: 405–412.
32. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. Cell Death Differ 2015; 22: 1: 58–73.
33. Manteca Á., Fernandes M., Sánchez J. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth. BMC Microbiol 2005; 5: 51.
34. Manteca Á., Fernandez M., Sánchez J. Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling events in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. Res Microbiol 2006; 157: 2: 143–152.
35. Manteca Á., Mäder U., Connolly B.A., Sánchez J. A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. Proteomics 2006; 6: 22: 6008–6022.
36. Manteca Á., Alvarez R., Salazar N., Yagüe P., Sánchez J. Mycelium differentiation and antibiotic production in liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 12: 3877–3886.
37. Manteca Á., Jung H.R., Schwämmle V., Jensen O.N., Sánchez J. Quantitative proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* in liquid cultures reveals the switch in metabolism associated with hyphae differentiation. J Proteome Res 2010a; 9: 9: 4801–4811.
38. Manteca Á., Sánchez J., Jung H.R., Schwämmle V., Jensen O.N. Quantitative proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrated that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. Moll Cell Proteomics 2010b; 9: 7: 1423–1436.
39. Yagüe P., López-García M. T., Rioseras B. et al. New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production. Curr Trends Microbiol 2012; 8: 65–73.
40. Yagüe P., López-García M.T., Rioseras B. et al. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. FEMS Microbiol Lett 2013a; 342: 2: 79–88.
41. Yagüe P., Rodríguez-García A., López-García M.T. et al. Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. PLoS One 2013; 8: 3: e60665.
42. Yagüe P., Rodríguez-García A., López-García M.T., Rioseras B., Martín J.F., Sánchez J. et al. Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. PLoS ONE 2014; 9: 1: e86296.
43. Yagüe P., Willemse J., Koning R.I., Rioseras B., López-García M.T., Gonzalez-Quinones N. et al. Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces hyphae*. Nat Commun 2016; 12: 7: 12467. doi: 10.1038/ncomms12467.
44. Rioseras B., López-García M.T., Yagüe P. et al. Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. Bioresource Technol 2014; 151: 191–198.
45. Yagüe P., Manteca Á., Simon A., Diaz-Garcia M.E., Sánchez J. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures // Appl Environ Microbiol 2010; 76: 10: 3401–3404.
46. Celler K., Picioreanu C., van Loosdrecht M. C., van Wezel, G. P. Structured morphological modeling as a framework for rational strain design of *Streptomyces species*. Antonie van Leeuwenhoek 2012; 102: 409–423.
47. Беккер О.Б., Мавлетова Д.А., Любимова И.К., Мирончева Т.А., Штиль А.А., Даниленко В.Н. Индукция программированного лизиса культуры *Streptomyces lividans* ингибиторами серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа. Микробиология 2012; 81: 2: 177–184. / Bekker O.B., Mavletova D.A., Ljubimova I.K., Mironcheva T.A., Shtil' A.A., Danilenko V.N. Indukcija programirovannogo lizisa kul'tury *Streptomyces lividans* ingibitorami serin-treoninovykh proteinkinaz jeukarioticheskogo tipa. Mikrobiologija 2012; 81: 2: 177–184. [in Russian]
48. Danilenko V.N., Osolodkin D.I., Lakatos S.A., Preobrazhenskaya M.N., Shtil' A.A. Bacterial Eukaryotic Type Serine-Threonine Protein Kinases: From Structural Biology to Targeted Anti-Infective Drug Design. Curr Top Med Chem 2011; 11: 11: 1352–1369.
49. Sánchez J., Yagüe P., Manteca Á. New insights in *Streptomyces* fermentation. Ferment Technol 2012; 1: 2: 1000e105.
50. Beites T., Oliveira P., Rioseras B., Pires S. D. S., Oliveira R., Tamagnini P. et al. *Streptomyces natalensis* programmed cell death and morphological differentiation are dependent on oxidative stress. Sci Rep 2015; DOI: 10.1038/srep12887.
51. Novotna J., Vohradsky J., Berndt P., Gramajo H., Langen H., Li X-M. et al. Article Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating Prokaryote. *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. Mol Microbiol 2003; 48: 5: 1289–1303. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03529.x.
52. Шапошников В.Н. Техническая микробиология. М.: Изд-во Совнаука; 1948. / Shaposhnikov V.N. Tekhnicheskaja mikrobiologija. M.: Izd-vo Sovnauka; 1948. [in Russian]
53. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. 6-ое изд. М.: Изд-во МГУ; Наука; 2004. / Egorov N.S. Osnovy uchenija ob antibiotikakh. 6-oe izd. M.: Izd-vo MGU; Nauka; 2004. [in Russian]
54. Rigali, S., Titgemeyer F., Barends Sh., Mulder S., Thomae A.W., Hopwood D. A. et al. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. EMBO Rep 2008; 9: 7: 670–675.
55. Кузнецов В.Н. Параллелизм в наследственной изменчивости и популяционная концепция вида у представителей прокариот. Журн общей биологии 1987; 48: 4: 466–476. / Kuznetsov V.N. Parallelizm v nasledstvennoj izmenchivosti i populacionnaja koncepcija vida u predstavitelej prokariot. Zhurn obshhej biologii 1987; 48: 4: 466–476. [in Russian]
56. Соколова З.Г., Виноградова К.А., Полин А.Н. Полиморфизм культуры *Streptomyces olivocinereus* — продуцента гелиомицина. Антибиотики и мед биотехнол 1987; 32: 1: 15–20. / Sokolova Z.G., Vinogradova K.A., Polin A.N. Polimorfizm kul'tury *Streptomyces olivocinereus* — producenta geliomicina. Antibiotiki i med biotekhnol 1987; 32: 1: 15–20. [in Russian]
57. Виноградова К.А., Кожевина Л.С. Изменчивость продуцента гелиомицина *Actinomyces variabilis* при культивировании в лабораторных условиях. Биол науки 1974; 10: 89–92. / Vinogradova K.A., Kozhevina L.S. Izmenchivost' producenta geliomicina *Actinomyces variabilis* pri kul'tivirovanii v laboratornykh usloviyakh. Biol nauki 1974; 10: 89–92. [in Russian]
58. Виноградова К.А., Нгуен Тхань Дат, Силаев А.Б. Внутривидовая изменчивость *Actinomyces aburaviensis* var. verrucosus. Биол науки 1975; 4: 89–93. / Vinogradova K.A., Nguen T Khan' Dat, Silaev A.B. Vnutrividovaja izmenchivost' *Actinomyces aburaviensis* var. verrucosus. Biol nauki 1975; 4: 89–93. [in Russian]
59. Соколова З.Г., Полянская Л.М., Виноградова К.А., Силаев А.Б. Естественная изменчивость по биосинтезу антибиотика в связи с процессами морфогенеза у *Actinomyces chromogenes* var. thriencus. Генетика 1975; 11: 8: 115–121. / Sokolova Z.G., Poljanskaja L.M., Vinogradova K.A., Silaev A.B. Estestvennaja izmenchivost' po biosintezu antibiotika v svyazi s processami morfogeneza u *Actinomyces chromogenes* var. thriencus. Genetika 1975; 11: 8: 115–121. [in Russian]
60. Vinogradova K.A., Kirillova N.P., Sokolova Z.G., Nicolau P.A., Shulgina M.V., Skvortsova G.N. et al. Regulation of heliomycin biosynthesis by carbon sources. Antibiotiki i Meditsinskaya Biotechnologiya 1985; 30: 4: 264–271.
61. Деянова О.А., Кириллова Н.П., Виноградова К.А., Королёв П.Н., Полин А.Н. Эффект L-арабинозы и сахарозы на биосинтез гелиомицина его продуцентом *Streptomyces olivocinereus* 11–98. Антибиотики и химиотер 1988; 33: 4: 248–252. / Dejanova O.A., Kirillova N.P., Vinogradova K.A., Korol'ov P.N., Polin A.N. Jeffect L-arabinozy i sakharozy na biosintez geliomicina ego producentom *Streptomyces olivocinereus* 11–98. Antibiotiki i khimioter 1988; 33: 4: 248–252. [in Russian]
62. Виноградова К.А., Деянова О.А., Кириллова Н.П. Разработка метода «покоящихся клеток» для изучения гелиомицин-синтезирующей системы *Streptomyces olivocinereus* 11–98. Антибиотики и химиотер 1988; 33: 12: 910–913. / Vinogradova K.A., Dejanova O.A., Kirillova N.P. Razrabotka metoda «pokojashihhsja kletok» dlja izuchenija geliomicin-sintezirujushhej sistemy *Streptomyces olivocinereus* 11–98. Antibiotiki i khimioter 1988; 33: 12: 910–913. [in Russian]

63. Соколова З.Г., Виноградова К.А., Артюхова В.И. Влияние концентрации глюкозы на рост и морфологию колоний стрептомицетов на плотных средах. Вестник МГУ 1985; Сер. 16: 1: 61—66. / *Sokolova Z.G., Vinogradova K.A., Artyukhova V.I. Vlijanie koncentracii glukozy na rost i morfologiju kolonij streptomicetov na plotnyh sredah. Vestnik MGU 1985; Ser. 16: 1: 61—66. [in Russian]*
64. van Dissel D., Claessen D., Roth M., van Wezel G.P. A novel locus for mycelial aggregation forms a gateway to improved *Streptomyces* cell factories. *Microbial Cell Factories* 2015; 14: 44: 2—10.
65. Мичурина Т.А., Миронов В.А. Взаимосвязь морфологических изменений и биосинтеза эритромицинов в глубоинной культуре *Saccharopolyspora erythraea*. /Антибиотики и химиотер 2005; 10—11: 58—63. / *Michurina T.A., Mironov V.A. Vzaimosvjaz' morfologicheskikh izmenenij i biosinteza eritromicinov v glubinnoj kul'ture Saccharopolyspora erythraea. /Antibiotiki i khimioter 2005; 10—11: 58—63. [in Russian]*
66. van Wezel G. P., Krabben P., Traag B. A., Keijser B. J. F., Kerste R., Vijgenboom E. et al. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Appl Environ Microb* 2006; 72: 8: 5283—5288.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Виноградова Ксения Александровна — к.б.н., старший научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Филиппова Светлана Николаевна — к.б.н., и.о. ведущего научного сотрудника Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, Москва

Полин Анатолий Николаевич — д.б.н., ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Современные проблемы инфекций, вызванных MRSA и пути их решения

С. К. ЗЫРЯНОВ^{1,2}, И. Н. СЫЧЕВ^{1,3}, Ю. Ш. ГУЩИНА¹

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва

³ Городская клиническая больница им. С. С. Юдина Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва

Current Problems of Infections Caused by MRSA and Ways to Address Them

S. K. ZYRYANOV^{1,2}, I. N. SYCHEV^{1,3}, YU. SH. GUSHCHINA¹

¹ RUDN University, Moscow

² City Clinical Hospital No. 24 of the Moscow City Health Department, Moscow

³ City Clinical Hospital named after S. S. Yudin of the Moscow City Health Department, Moscow

В последние годы увеличение темпа роста MRSA, как этиологического фактора было зафиксировано во всем мире. Основной проблемой антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus* является устойчивость к бета-лактамам антибиотикам. Ранее MRSA традиционно рассматривался как исключительно нозокомиальный патоген, однако в последние годы стал выделяться у пациентов с внебольничными инфекциями, главным образом кожи и мягких тканей. Доля инфекций, вызванных MRSA, у госпитализированных пациентов неизменно растёт, а наиболее часто используемые в клинической практике антибактериальные препараты с анти-MRSA активностью имеют определённые ограничения к применению, обусловленные профилем безопасности, необходимостью проведения терапевтического лекарственного мониторинга или интенсивного лабораторного контроля во время терапии. Появление нового представителя класса оксазолидинонов — тедизолида — имеет важное значение для терапии инфекций, вызванных MRSA. Тедизолид в 4–32 раза *in vitro* активнее, чем линезолид в отношении стафилококков, энтерококков и стрептококков. Потенциально важным является сохранение *in vitro* чувствительности к тедизолиду многих штаммов, устойчивых к линезолиду. Два исследования 3 фазы у пациентов с инфекциями кожи и мягких тканей показали, что относительно короткий 6-дневный курс терапии тедизолидом в дозе 200 мг 1 раз/сут не уступает по эффективности и безопасности стандартному по длительности режиму терапии линезолидом в дозе 600 мг 2 раза/сут в течение 10 дней. В целом число клинических исследований тедизолида пока ограничено, однако имеющиеся данные позволяют рассматривать его как эффективный препарат с благоприятным профилем безопасности, зарегистрированный для лечения осложнённых инфекций кожи и мягких тканей, в т.ч. вызванных резистентными к другим антибиотикам грамположительными возбудителями.

Ключевые слова: оксазолидиноны, тедизолид, линезолид, инфекции кожи и мягких тканей, *Staphylococcus aureus*, MRSA.

The increase in the growth rate of MRSA as an etiologic factor has been recorded worldwide in recent years. The main problem of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* is its resistance to beta-lactam antibiotics. Previously, MRSA has traditionally been considered as an exclusively nosocomial pathogen, but in recent years it has become prominent in patients with community-acquired infections, mainly of skin and soft tissues. The proportion of infections caused by MRSA in hospitalized patients is steadily increasing, and the antibiotic drugs most often used in clinical practice with anti-MRSA activity have certain usability limitations due to the safety profile, the need for therapeutic drug monitoring or intensive laboratory monitoring during therapy. The appearance of a new representative of oxazolidinone class of antibiotics — tedizolid — is important for the treatment of infections caused by MRSA. Tedizolid is 4–32 times more active against staphylococci, enterococci and streptococci *in vitro* than linezolid. It is potentially important that many strains resistant to linezolid maintain *in vitro* susceptibility to tedizolid. Two Phase 3 studies in patients with acute bacterial skin and soft tissues infections have shown that a relatively short course of therapy with tedizolid at a dose of 200 mg once daily for 6 days is not inferior in effectiveness and safety to the standard long-term linezolid course at a dose of 600 mg 2 times per day for 10 days. In general, the number of clinical studies of tedizolid is limited, but the available data allow to consider it as an effective drug with a favorable safety profile, registered for the treatment of complicated skin and soft tissue infections, including the ones caused by G(+) pathogens resistant to other antibiotics.

Keywords: oxazolidinone, tedizolid, linezolid, skin and soft tissues infections, *Staphylococcus aureus*, MRSA.

Введение

В 1878 г. Робертом Кохом был впервые открыт стафилококк, и с тех пор он является одним из

наиболее часто встречающихся возбудителей инфекций человека. *Staphylococcus aureus* является этиологическим агентом более 100 нозологических форм заболеваний [1].

В России по результатам проведённого исследования «МАРАФОН» доля *S. aureus* в структуре бактериальных возбудителей нозокомиальных ин-

© Коллектив авторов, 2017

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

фекций составила 11%. Как этиологический фактор *S.aureus* в структуре возбудителей ИКМТ составил 43,7%, инфекций дыхательных путей — 33,9% и инфекций кровотока — 12,6% [2].

В США на долю всех инфекций, вызванных *Staphylococcus aureus*, приходится 13% [3].

Первое сообщение о выделении MRSA появилось в 1961 г. Резистентность MRSA обусловлена появлением нового пенициллинсвязывающего белка со сниженным аффинитетом к бета-лактамам, кодируемого геном *mec A*.

В последние годы увеличение темпа роста MRSA как этиологического фактора было зафиксировано во всем мире [4, 5]. В большинстве стран, включая США, страны Латинской Америки, ЮАР, Индию и Китай, среди всех выделенных штаммов *S.aureus*, метициллинорезистентные штаммы составили до 25% [6]. Аналогичная ситуация складывается и в Европе: из всех выделенных штаммов *S.aureus* 18% приходится на MRSA [5]. В России по результатам исследования «МА-РАФОН» доля MRSA составила 24,9% [2].

Основной проблемой антибиотикорезистентности *S.aureus* является устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, которая часто характеризуется устойчивостью к другим классам антибактериальных препаратов, в частности к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам [7].

Ранее MRSA традиционно рассматривался как исключительно нозокомиальный патоген, однако в последние годы стал выделяться у пациентов с внебольничными инфекциями, главным образом кожи и мягких тканей [8—10]. В США частота выделения MRSA среди амбулаторных больных составляет 48%, среди госпитализированных — 60%. По мнению ряда исследователей, одной из причин роста заболеваемости является увеличение частоты назофарингеальной колонизации MRSA, причём свыше 80% вызывающих патологический процесс штаммов ранее персистировали у пациентов в полости носа [11]. Внебольничные штаммы MRSA генетически и фенотипически отличаются от нозокомиальных, имеют особый, IV тип стафилококковой хромосомной кассеты и характеризуются большей чувствительностью к антибиотикам (обычно устойчивы к бета-лактамам при сохранении чувствительности к клиндамицину и фторхинолонам). Кроме того, внебольничные MRSA отличаются высокой вирулентностью за счёт продукции ряда экзотоксинов, в частности лейкоцидина Пантон-Валентайна.

Наиболее характерными инфекциями, вызываемыми внебольничными MRSA, являются тяжёлые и рецидивирующие инфекции мягких тканей. Эти инфекции наиболее часто диагностируются у определённых категорий пациентов (спортсмены, призывники, заключенные, ветеринары, лица, проживающие в домах престарелых, наркоманы, лица без определённого места жительства) [12, 13].

Факторы риска MRSA-инфицирования

По результатам исследования CallejoTorre et al. [14], охватывающего около 70 000 пациентов из 147 отделений интенсивной терапии в Испании, определены следующие факторы риска MRSA-инфицирования:

- предшествующая госпитализация;
- предшествующая антибактериальная терапия;
- внутрисосудистые катетеры;
- назофарингеальное носительство MRSA;
- возраст больше 65 лет;
- хронические заболевания (диабет, сердечно-сосудистые заболевания и хроническая почечная недостаточность);
- иммунодепрессивные состояния.

Инфекции кожи и мягких тканей (ИКМТ)

Во всем мире наиболее частыми возбудителями осложнённых ИКМТ являются грамположительные кокки, в первую очередь *S.aureus* на его долю приходится до 50% всех выделяемых штаммов [15].

ИКМТ — это одна из актуальных проблем современной медицины. В экономически развитых странах на их долю приходится до 1/3 всех инфекционных заболеваний [16]. Ведущее место среди хирургических инфекций как по частоте развития, так и по возможным осложнениям занимают гнойные заболевания кожи и мягких тканей [17, 18].

В структуре нозокомиальных инфекций частота хирургических инфекций мягких тканей (послеоперационные нагноения, постинъекционные осложнения и т.д.) достигает 36% [19], в России — 24% [20]. ИКМТ занимают третье место по частоте в этиологической структуре сепсиса.

Значимость проблемы хирургических ИКМТ подчеркивается тем фактом, что в структуре первичной обращаемости к общему хирургу их частота достигает 70%. Инфекции кожи и мягких тканей — наиболее частая причина обращения пациентов за хирургической помощью: 10% госпитализаций в Великобритании, в США ИКМТ являются причиной 330 000 госпитализаций в год [16, 19, 20].

В хирургических стационарах России пациенты с ИКМТ составляют 38,67% всех больных гнойно-воспалительными заболеваниями. В поликлиниках по поводу ИКМТ ежегодно лечатся около 2 млн больных [16, 19].

Доля пациентов с заболеваниями данного профиля, находящихся в трудоспособном возрас-

те, составляет 75%. Средние сроки трудопотерь при амбулаторном лечении колеблются от 13,6 до 17,6 сут; при стационарном лечении — от 18,5 до 23,8 сут [21–23].

В последние годы отмечается заметный рост частоты госпитализаций по поводу указанных инфекций, что обусловлено увеличением доли пациентов с осложнённым течением, а также объективными трудностями выбора адекватной эмпирической антибактериальной терапии (АБТ) [24].

С этиологической точки зрения ИКМТ являются обычно бактериальными и во многих случаях — полимикробными. Бактерии, которые чаще всего участвуют в процессе, — это *S.aureus*, *Streptococcus* spp. (*Streptococcus pyogenes* и в меньшей степени — стрептококки групп В, С и G), энтеробактерии и анаэробные микроорганизмы (*Bacteroides* группы *fragilis* и *Clostridium* spp.) [21, 25, 26].

В этиологии инфекций кожи и мягких тканей метициллинорезистентные стафилококки играют важную роль. По данным международного исследования SENTRY, среди штаммов *S.aureus*, изолированных в период с 1998 по 2004 гг. у больных с инфекцией кожи и мягких тканей, метициллинорезистентные штаммы составили 20–30% в Европе и Латинской Америке и до 35% в Северной Америке [3]. В России при исследовании клинического материала от пациентов с ИКМТ доля штаммов *S.aureus* составила 86,5% (275/318), причём доля MRSA составила критические 60,4% (166/275). При оценке возбудителей из различных отделений стационара были получены ещё более угрожающие данные о том, что в отделениях хирургической инфекции и ожоговых отделениях частота выделения MRSA гораздо выше — 84,9% (101/119) при сходных показателях выделения золотистого стафилококка в качестве возбудителя — 86,9% (119/137) [16].

Стафилококковые пневмонии

Среди пневмоний различной этиологии стафилококковая пневмония занимает особое место. Это обусловлено тяжёлым течением заболевания, резистентностью к проводимой терапии, сложностями дифференциальной диагностики, высокими показателями летальности. Впервые стафилококковая пневмония была описана Chickering и Park в 1919 г. [27].

Одним из важнейших этиологических агентов нозокомиальной пневмонии является *S.aureus*.

Нозокомиальная пневмония (НП) — одна из основных видов инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Риск смерти при НП выше, чем при других нозокомиальных инфекциях [28, 29]. На 1000 госпитализаций приходится от 5 до 15 случаев НП, что составляет около 15% всех внутрибольничных инфекций. Она развивается у 0,5–1,7% госпитализированных больных [30–32].

В ОРИТ на долю НП приходится 25% всех инфекционных осложнений, на лечение НП расходуется более половины антимикробных препаратов, назначаемых в этом отделении [33]. Из всех случаев нозокомиальной пневмонии, регистрируемых в стационаре, 70–80% развивается в ОРИТ. Это увеличивает длительность лечения в среднем на неделю и приводит к затратам, превышающим \$40 000 на пациента [34, 35].

НП может вызываться различными возбудителями и иметь полимикробный характер. Нозокомиальная пневмония наиболее часто вызывается аэробными грам(–) микроорганизмами, такими как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter* spp. В последнее время отмечается увеличение частоты НП, вызываемых грам(+) бактериями, включая метициллинорезистентные *S.aureus*. По данным Российского исследования «МАРАФОН», в 2013–2014 гг. доля *S.aureus* в структуре НП составила 33,9%, а MRSA — 24,9% [2].

В США на долю *S.aureus* в этиологической структуре НП приходится 36,3%, в Европе — 23%, в Латинской Америке — 20,1% [36].

В Европе MRSA в этиологической структуре НП составляет 16% [37].

За последнее время увеличилось число внебольничных пневмоний, вызванных *S.aureus*.

Согласно данным официальной статистики РФ (Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения Минздрава РФ), в 2012 г. в РФ было зарегистрировано 657643 случая заболевания ВП, что составило 4,59‰; у лиц в возрасте >18 лет заболеваемость составила 3,74‰. Однако эти цифры не отражают истинной заболеваемости ВП в РФ, которая, согласно расчётам, достигает 14–15‰, а общее число больных ежегодно превышает 1,5 млн человек.

В США ежегодно регистрируется 5–6 млн случаев ВП, из них около 1 млн человек требуют госпитализации в стационар. По приблизительным подсчётам, на каждые 100 случаев ВП около 20 больных нуждаются в стационарном лечении, из них 10–36% в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Среди госпитализированных больных в Европе и США доля пациентов с ТВП составляет от 6,6 до 16,7%.

Несмотря на успехи, достигнутые в АБТ, респираторной поддержке и терапии сепсиса, летальность среди больных с тяжёлой ВП составляет от 21 до 58%. Согласно данным статистики США, среди всех причин летальности ВП занимает 8-е место, а общая доля смертей от ВП среди всех смертей в 2004 г. составляла 0,3% [38].

Описано более ста микроорганизмов (бактерии, вирусы, грибы, простейшие), которые при определённых условиях могут являться возбудите-

лями ВП. Однако большинство случаев заболевания ассоциируется с относительно небольшим кругом патогенов. К числу наиболее актуальных «типичных» бактериальных возбудителей тяжёлой ВП относятся *Streptococcus pneumoniae*, энтеробактерии — *K.pneumoniae* и др., *S.aureus*, *Haemophilus influenzae* [38].

В 70—80 гг. XX века *S.aureus* занимал около 1% в этиологической структуре ВП [39].

В настоящее время увеличилось число ВП, вызванных *S.aureus*. Доля *S.aureus*, как этиологического фактора ВП, отличается в разных странах от 1% — в Нидерландах до 11,7% — во Франции. Различается доля *S.aureus* в этиологии ВП у разных групп пациентов: у амбулаторных пациентов — 1,5%, госпитализированных пациентов — 3%, у пациентов, госпитализированных в ОРИТ — 9% [40]. По данным другого Европейского исследования, в этиологической структуре ВП *S.aureus* составляет 16%, а при этом большая часть стафилококков из выделенных изолятов представлена метициллинорезистентными штаммами — 12% [41].

Внебольничные пневмонии, вызванные MRSA, характеризуются неблагоприятным прогнозом и высокими показателями летальности — 35,7% в сравнение с ВП, вызванной *S.pneumoniae* — 9,2% [42].

Инфекции кровотока

С увеличением числа катетеризаций сосудистого русла растёт частота такого осложнения, как катетер-ассоциированные инфекции кровотока (КАИК). Ежегодно до 500 000 случаев нозокомиальных инфекций кровотока отмечается в США, 250 000 связаны с установкой внутрисосудистого катетера, в том числе 80 000 — в ОРИТ [43, 44]. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока занимают третье место среди всех нозокомиальных инфекций и первое место среди причин бактериемии, составляя около 10% всех инфекций у госпитализированных пациентов, 20% всех нозокомиальных инфекций и до 87% первичных бактериемий [45]. Данная патология ведёт не только к увеличению сроков пребывания в стационаре в среднем на 2—3 нед, но и к повышению стоимости лечения: дополнительные затраты составляют 33000—44000 долл. США [45, 46]. В США смертность от инфекций кровотока составляет 12—25% от всех летальных исходов при нозокомиальных инфекциях [43].

Спектр микроорганизмов, вызывающих инфекции кровотока, зависит от ряда факторов, таких как степень тяжести состояния пациента, тип катетера, профиль отделения, пути инфицирования и т. д.

По данным European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), наиболее часто при инфекции кровотока выделяются коагулазонегативные стафилококки (26—28%) и *S.aureus* (12—

14%). Реже выделяются другие возбудители, такие как *Enterococcus* spp. (6—9%), *Candida* spp. (6—7%), *Pseudomonas* spp. (7—8%), а также представители семейства Enterobacteriaceae (4—6%) [47].

В России, по результатам исследования «МАРАФОН», *S.aureus* в структуре бактериальных возбудителей инфекции кровотока составил 12,6%, а на долю MRSA приходилось — 22,2% [2].

Широкое распространение в стационарах штаммов, устойчивых к метициллину (MRSA), увеличивает частоту неадекватной стартовой антибактериальной терапии стафилококковых инфекций. Инфекции, вызванные MRSA, имеют большое медицинское и социальное значение, так как сопровождаются более высокой летальностью и требуют больших материальных затрат на лечение [48, 49].

В исследовании, проведённом в двух клиниках г. Дарем (штат Северная Каролина), было показано, что при развитии инфекционных осложнений в послеоперационном периоде, связанных с MRSA, 90-дневная летальность возрастает в 12 раз [50]. По данным того же исследования, послеоперационные инфекционные осложнения, связанные с MRSA, увеличивают пребывание в отделении реанимации и общую длительность госпитализации [50].

В США у пациентов хирургического профиля без инфекционных осложнений средний расход на лечение во время пребывания в стационаре составляет 34 395 долл. США. При развитии инфекционных осложнений в послеоперационном периоде, связанных с метициллиночувствительным *S.aureus*, средняя стоимость пребывания в стационаре составляет 73 165 долл. США, а при инфекции, вызванной MRSA, средняя стоимость возрастает до 118 415 долл. США [50].

Антибактериальные препараты, обладающие активностью против метициллинорезистентных стафилококков

Высокая актуальность MRSA при инфекциях кожи и мягких тканей подразумевает включение в протоколы лечения антибактериальных препаратов, активных против этих микроорганизмов (даптомицин, цефтаролин, линезолид, ванкомицин, тигециклин, телаванцин, тедизолид), в том числе в качестве средств эмпирической терапии при наличии факторов риска MRSA-инфекций [51—55].

Доля инфекций, вызванных MRSA, у госпитализированных пациентов неизменно растёт, а наиболее часто используемые в клинической практике антибактериальные препараты с анти-MRSA активностью имеют определённые ограничения к применению, обусловленные профи-

лем безопасности, необходимостью проведения терапевтического лекарственного мониторинга или интенсивного лабораторного контроля во время терапии [56, 57].

Ванкомицин

По-прежнему во всем мире ванкомицин остаётся одним из наиболее часто используемых антимикробных препаратов при выделении метициллинорезистентных штаммов стафилококка [61].

Ванкомицин — это природный антибиотик из группы гликопептидов, продуцируемых различными представителями почвенных актиномицетов. Механизм действия ванкомицина связан с нарушением синтеза клеточной стенки бактерий. Он оказывает бактерицидное действие, однако в отношении энтерококков, некоторых стрептококков и КНС действует бактериостатически. До 2000 г. фактически единственной группой антибиотиков, сохранявших высокую активность против полирезистентных грам(+) штаммов были гликопептиды, а точнее их основной представитель — ванкомицин. Однако применение данного препарата имеет целый ряд ограничений. Широкое использование ванкомицина в последние десятилетия сопровождается повышением его минимальной подавляющей концентрации препарата (МПК). В России, по данным исследования «МАРАФОН», для 3,9% MRSA штаммов МПК ванкомицина составила 2 мг/мл [2]. Так, при МПК 0,5 мг/мл клиническая неэффективность ванкомицина составляет 48% и повышается до 90% при МПК >2,0 мг/мл, по данным клинических исследований [59–61]. При МПК 1,5 или 2 мкг/мл обоснованно увеличение суточной дозы до 3–4,5 г (нагрузочная доза 25–30 мг/кг), однако это повышает риск нефротоксичности и требует мониторинга сывороточной концентрации ванкомицина [62, 63].

Фармакокинетические параметры ванкомицина, в частности не очень большой объём распределения (0,2–1,25 л/кг), снижают проникновение препарата в инфицированные ткани лёгких, головного мозга и мозговых оболочек, ограничивают использование его при генерализованных формах инфекции с развитием сепсиса и полиорганной недостаточности [16].

Даптомицин

Даптомицин — первый представитель нового класса циклических липопептидов с быстрым дозозависимым бактерицидным действием на грамположительную микрофлору, включая MRSA и штаммы, резистентные к метициллину, ванкомицину и линезолиду [64].

Даптомицин был получен из *Streptomyces roseosporus* в ходе изучения спектра антимикробной активности веществ, продуцируемых почвенными микроорганизмами [65]. Механизм действия даптомицина является поэтапным процессом. В химиче-

ской структуре даптомицина имеется липидный фрагмент, который в присутствии ионов кальция встраивается в цитоплазматическую мембрану клетки грамположительной бактерии, в результате чего образуется ионпроводящая структура. Это приводит к выходу катионов (в основном ионов кальция) из микробной клетки, деполяризации мембраны и, как следствие, ингибированию синтеза макромолекул и быстрой гибели бактерии [66, 67].

Возможность сохранять активность в биоплёнках расширяет возможности применения препарата. Даптомицин способен ингибировать MRSA в биоплёнках после 24 ч экспозиции в отличие от ванкомицина и линезолида [68, 69].

Даптомицин достаточно хорошо переносится: так, из 534 пациентов с осложнёнными инфекциями кожи и мягких тканей, получавших даптомицин в рандомизированных клинических исследованиях, миопатии были зафиксированы только в 0,2% случаев и полностью разрешились после окончания терапии [70].

Высокая бактерицидная активность, сохраняющаяся в биоплёнках, удобный режим дозирования и безопасность позволяют использовать препарат и при осложнённых инфекциях кожи и мягких тканей в дозе 4 мг/кг 1 раз в сутки и при инфекциях кровотока, вызванных *S.aureus*, включая бактериемию и правосторонний эндокардит, в дозе 6 мг/кг 1 раз в сутки [71, 72].

Цефтаролин

Цефтаролин — новый цефалоспориновый антибиотик, обладающий значимой активностью в отношении многих возбудителей инфекций человека, включая некоторые «проблемные», с точки зрения антибиотикорезистентности, микроорганизмы. Обладает широким спектром действия в отношении энтеробактерий, за исключением штаммов, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы, высокой антианаэробной активностью в отношении грамположительных анаэробов. Однако препарат не обладает активностью в отношении *Bacteroides fragilis*, неферментирующих бактерий — *P.aeruginosa* и *Acinetobacter*, а также атипичных микроорганизмов. Главной особенностью препарата, по сравнению с другими бета-лактамами, является активность в отношении метициллинорезистентных штаммов *S.aureus* [76].

Механизм действия, как и у всех цефалоспоринов обусловлен ингибированием биосинтеза клеточной стенки бактерий за счёт связывания с пенициллинсвязывающими белками. Цефтаролин оказывает бактерицидное действие. После парентерального введения пролекарство цефтаролина фосамил претерпевает быстрое превращение в активный цефтаролин под действием фосфатаз крови [74].

Широкая бактерицидная активность, удобный режим дозирования, безопасность и хоро-

шая переносимость, позволяет успешно применять цефтаролин при внебольничной пневмонии, а также при инфекциях кожи и мягких тканей в дозе 600 мг каждые 12 ч. [75]. Цефтаролин — перспективный препарат для эмпирической терапии ИКМТ с высоким риском MRSA — что подтверждено в исследовании CAPTURE — положительный результат в 80% [76]. Основное ограничение эмпирического назначения цефтаролина — это инфекции с высоким риском *P.aeruginosa* в качестве этиологического фактора.

Тигециклин

Тигециклин является представителем нового класса антибиотиков — глицилциклинов. Глицилциклины — полусинтетические АМП, имеющие структурное родство с антибиотиками тетрациклинового ряда, однако способные преодолевать два основных механизма микробной резистентности к тетрациклинам («защиту рибосом» и эффлюкс) [77].

Тигециклин активен в отношении многих грамположительных, включая MRSA, и грамотрицательных микроорганизмов, включая штаммы, обладающие механизмами резистентности к другим классам антибиотиков, за исключением антисинегнойной активности [78].

Тигециклин оказывает бактериостатическое действие, обусловленное подавлением синтеза белка в бактериальной клетке. Тигециклин обратимо связывается с определённым участком 30S-субъединицы рибосом, препятствуя поступлению аминокислот — тРНК в А-участок рибосомы и прекращая, таким образом, присоединение аминокислотных остатков к синтезируемой белковой цепи [79].

По данным клинических исследований, тигециклин демонстрирует высокую эффективность у взрослых пациентов при лечении внебольничных пневмоний, осложнённых инфекций кожи и мягких тканей, осложнённых интраабдоминальных инфекций, вызванных резистентными грамположительными и грамотрицательными возбудителями [80]. Тигециклин вводится внутривенно однократно 100 мг, затем по 50 мг 2 р/сут. Курс лечения при ОИКМТ и ОИАИ составляет 5—14 дней, при ВП 7—14 дней и, как правило, определяется тяжестью, локализацией инфекции и клиническим ответом пациента на лечение [81].

Телаванцин

Телаванцин является полусинтетическим липогликопептидом — первым представителем нового поколения гликопептидов, в отличие от ванкомицина и тейкопланина — немодифицированных молекул природного происхождения [82].

Телаванцин оказывает быстрый бактерицидный эффект на широкий спектр грам(+) бактерий за счёт двойного механизма действия.

Во-первых, как и ванкомицин, телаванцин ингибирует финальные стадии синтеза клеточной стенки за счёт связывания с D-аланин-D-аланин остатками мономеров пептидогликана, что приводит к нарушению полимеризации и формирования поперечных сшивок между цепями пептидогликана [83].

Во-вторых, в отличие от ванкомицина, телаванцин также нарушает функционирование мембраны бактериальной клетки, приводя к повышению её проницаемости с последующим выходом из бактериальной клетки АТФ и калия, что сопровождается нарушением мембранного потенциала (деполяризацией мембраны) [83].

Подобный комбинированный механизм действия объясняет существенно большую скорость и степень бактерицидности телаванцина по сравнению с ванкомицином, а также активность телаванцина в отношении штаммов со сниженной чувствительностью к ванкомицину и даптомицину [87].

Телаванцин оказывает быстрый бактерицидный эффект в отношении большинства клинически значимых грам(+) бактерий, включая полирезистентные штаммы, такие как метициллинорезистентные штаммы *S.aureus* (MRSA), штаммы *S.aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (VISA), пенициллинорезистентные штаммы *Streptococcus pneumoniae*. Спектр активности телаванцина включает также другие стрептококки, энтерококки (кроме штаммов с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину), *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium* spp., а также грам(+) анаэробы (актиномицеты, клостридии, *Propionibacterium* spp., лактобактерии) [85, 86].

Высокая клиническая эффективность препарата при лечении больных с осложнённой инфекцией кожи и мягких тканей и нозокомиальной пневмонией (включая вентилятор-ассоциированную пневмонию) доказана в двух больших рандомизированных слепых исследованиях [87, 88]. Взрослым пациентам телаванцин применяется в дозе 10 мг/кг путём внутривенной инфузии продолжительностью не менее 60 мин каждые 24 ч. У пациентов с нарушением функции почек и при клиренсе креатинина от 30 до 50 мл/мин телаванцин вводится в дозе 7,5 мг/кг каждые 24 ч.

Линезолид

Линезолид — первый препарат из группы оксазолидинонов, обладающий высокой активностью на грамположительную микрофлору. Механизм действия линезолида связан с ингибированием синтеза белка в рибосомах бактериальной клетки; действуя на ранние этапы трансляции, необратимо связывается с 30S- и 50S-субъединицей рибосомы, вследствие чего нарушаются процесс образования 70S-комплекса и формирование пептидной цепи.

Обладает активностью в отношении подавляющего большинства как аэробных, так и анаэробных грамположительных микроорганизмов, включая *Staphylococcus* spp. (в том числе MRSA и MRSE), *Enterococcus* spp. (в том числе ванкомицинорезистентные штаммы), *S.pneumoniae* (в том числе АП), *Streptococcus* spp., *Nocardia* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp. Линезолид не действует на большинство грамотрицательных микроорганизмов, однако проявляет умеренную *in vitro* активность в отношении *M.catarrhalis*, *H.influenzae*, *Legionella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *P.multocida*, а также некоторых грамотрицательных анаэробов (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium nucleatum*) [89].

Препарат обладает достаточно большим объемом распределения — 40—50 л и создаёт высокие концентрации во многих тканях и средах организма. При приёме внутрь быстро и хорошо всасывается, биодоступность составляет около 100%, не зависит от приёма пищи [90].

По данным проведённых исследований, линезолид обладает большей клинической и микробиологической эффективностью по сравнению с ванкомицином при лечении нозокомиальной пневмонии (НП) и ИКМТ, вызванных MRSA [91].

В связи с наличием внутривенной и таблетированной формы возможно проведение ступенчатой терапии и терапии в амбулаторных условиях [92].

Однако использование линезолида имеет ряд ограничений в клинической практике. Важнейшей проблемой является потенциальный риск гематологических побочных эффектов, главным образом тромбоцитопении и анемии, которые наиболее часто развиваются у пациентов с длительностью лечения более 2 недель и/или, если плазменная концентрация превышает 8 мг/л. По этой причине для пациентов, получающих линезолид, будет полезен терапевтический лекарственный мониторинг [93, 94].

Линезолид является слабым обратимым неселективным ингибитором моноаминоксидазы, обладающим способностью к взаимодействию с серотонинергическими веществами, вызывающими серотониновый синдром. В связи с этим линезолид следует использовать с осторожностью в сочетании с препаратами с серотонинергической активностью, например с антидепрессантами из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина [95].

Тедизолид

Тедизолид — новый представитель класса оксазолидинонов с преимущественной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов. Антибактериальное действие тедизо-

лида обусловлено связыванием с V-доменом 23S рРНК, которая является компонентом 50S-субъединицы бактериальной рибосомы, что приводит к ингибированию синтеза белка. Оказывает бактериостатическое действие при клинически значимых концентрациях [96].

Спектр антибактериальной активности

Тедизолид проявляет высокую активность в отношении аэробных грамположительных микроорганизмов. По эффективности тедизолид в 4—32 раза превосходит линезолид в отношении *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. [97—99]. МПК₅₀ и МПК₉₀ (минимальные подавляющие концентрации для 50 и 90% штаммов) тедизолида в отношении *S.aureus* в 4—8 раз ниже, чем соответствующие показатели для линезолида [100]. Тедизолид активен в отношении штаммов, резистентных к линезолиду, а также к ванкомицину и даптомицину [100—102]. В нескольких исследованиях показано, что МПК₅₀ тедизолида в отношении большинства грамположительных микроорганизмов, включая *S.aureus*, составляет 25 мкг/мл [100, 102]. МПК₉₀ препарата одинаков для метициллинчувствительных штаммов *S.aureus* (MSSA — Methicillin-Sensitive *S.aureus*) и MRSA [100].

Тедизолид также продемонстрировал отличную активность *in vitro* в отношении 28 клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* [103]. При этом его МПК (МПК₅₀ и МПК₉₀ — 0,25 мкг/мл) были значительно ниже, чем у линезолида (МПК₅₀ — 0,5 мкг/мл и МПК₉₀ — 1,0 мкг/мл). МПК тедизолида в отношении *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus pyogenes*, выделенных у пациентов с инфекциями кожи и мягких тканей, не превышали 0,25 и 0,12 мкг/мл, соответственно [104], а МПК₉₀ в отношении энтерококков, включая резистентных к ванкомицину (0,5—1,0 мкг/мл), были в 2—4 раза ниже, чем у линезолида [98].

По активности в отношении анаэробных микроорганизмов тедизолид по крайней мере не уступает линезолиду или превосходит его [98]. Его активность в отношении грамотрицательных микроорганизмов незначительная [105, 106].

Фармакокинетика

Фармакокинетика тедизолида носит линейный характер при введении как однократной, так и многократных доз [104, 107] и сходна при пероральном и внутривенном введении [108]. Фосфат тедизолида — пролекарство, которое превращается в тедизолид под воздействием эндогенных фосфатаз [105].

При введении внутрь препарат быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта. Биодоступность препарата при приёме внутрь в дозе 200 мг составила 91%. Максимальная концентрация

($C_{\max}$) тедизолида в плазме крови достигается примерно в течение трёх часов после приёма внутрь натошак и составляет 2 мкг/мл. Приём пищи замедляет всасывание тедизолида: $C_{\max}$ достигается через 8 ч, но не изменяет AUC. Период полувыведения — 10,6 ч [109]. При внутривенном введении тедизолид достигает максимальной концентрации в конце первого часа внутривенной инфузии тедизолида фосфата [107, 109]. В крови препарат примерно на 89% связывается с белками плазмы. Его объём распределения превышает таковой у линезолида и составляет приблизительно 70 л. Высокие концентрации тедизолида создаются в жировой ткани и скелетной мускулатуре [110]. В лёгочной ткани концентрация тедизолида выше чем линезолида, относительно плазменных концентраций [111].

После однократного перорального применения тедизолида фосфата натошак выведение в основном осуществлялось через печень, при этом 82% дозы выводится через кишечник, а 18% почками, преимущественно в виде нециркулирующего и микробиологически неактивного конъюгата с сульфатом. Большая часть тедизолида (более 85%) выводится в течение 96 ч. Менее 3% введённой дозы тедизолида фосфата выводится почками и через кишечник в виде неизменённого тедизолида. При 7-дневном пероральном приёме препарата в дозе 200 мг наблюдалась его минимальная (28 %) кумуляция [107, 109]. Фармакокинетика препарата не различалась у взрослых и пожилых лиц [110]. После однократного приёма внутрь 200 мг тедизолида не наблюдалось клинически значимых изменений средних величин $C_{\max}$ и AUC для тедизолида у пациентов с умеренной или тяжёлой печеночной недостаточностью (класс В и С по классификации Чайлд-Пью) в сравнении со здоровыми испытуемыми из группы контроля. У пациентов с печеночной недостаточностью коррекции дозы не требуется. У пациентов с тяжёлой почечной недостаточностью после однократного внутривенного введения 200 мг тедизолида при расчётной скорости клубочковой фильтрации (рСКФ) менее 30 мл/мин/1,73 м², $C_{\max}$ существенно не изменялась, а AUC₀ снижа-

лась менее чем на 10% в сравнении со здоровыми испытуемыми из группы контроля. Гемодиализ не приводит к значимому удалению тедизолида из системного кровотока: менее 10% от дозы, введённой внутривенно. У пациентов с почечной недостаточностью или находящихся на гемодиализе коррекции дозы не требуется [112].

Клиническая эффективность препарата доказана в международных рандомизированных исследованиях 3 фазы ESTABLISH-1 и ESTABLISH-2. Шестидневный курс тедизолида по 200 мг 1 р/сут был так же эффективен, как и 10-дневный курс линезолида по 600 мг 2 р/сут при лечении больных с инфекциями кожи и мягких тканей, включая случаи, вызванные MSSA и MRSA. Переносимость обоих препаратов была в целом сопоставимой. Наиболее частым побочным эффектом была тошнота (тедизолид — 8,2%; линезолид — 12,2%; $p=0,02$). По сравнению с линезолидом тедизолид характеризовался статистически значимо более низкой частотой развития тромбоцитопении (тедизолид — 4,9%; линезолид — 10,8%; $p=0,0003$) [113]. Тедизолид в *in vivo* исследованиях не показал клинически значимого серотонинергического эффекта, в связи со слабым ингибированием моноаминоксидазы [114].

Использование тедизолида вместо линезолида при лечении осложнённых инфекций кожи и мягких тканей, вызванных грамположительными возбудителями, при расчёте на 100 пациентов приводит к экономии бюджета многопрофильного стационара в размере до 429 тыс рублей при равной эффективности лечения. Более короткий шестидневный курс лечения тедизолидом повышает эффективность использования коечного фонда до 8,1% и является предпочтительной альтернативой с фармакоэкономической точки зрения [99].

В целом число клинических исследований тедизолида пока ограничено, однако имеющиеся данные позволяют рассматривать его как эффективный препарат с благоприятным профилем безопасности, зарегистрированный для лечения осложнённых инфекций кожи и мягких тканей, в т.ч. вызванных резистентными к другим антибиотикам грам(+) возбудителями [115].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339 (8): 520—532.
2. Романов А.В., Дехнич А.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В. и соавт. Антибиотикорезистентность нозокомальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2013—2014 гг. Клин микробиол антимикроб химиотер 2017; 19 (1): 57—62. / Romanov A.V., Dekhnich A.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Ju., Ivanchik N.V. i soavt. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtammov *Staphylococcus aureus* v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo jepidemiologicheskogo issledovanija MARAFON v 2013—2014 gg. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2017; 19 (1): 57—62. [in Russian]
3. Moet G.J., Jones R.N., Biedenbach D.J. et al. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998—2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 7—13.
4. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Available at <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. [Accessed 5 November 2016].
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2014. Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>. [Accessed 29 October 2016]
6. The Center for Disease Dynamics, Economics and Policy (CDDEP). The state of the world's antibiotics 2015. Available at https://cddep.org/sites/default/files/swa_2015_final.pdf. [Accessed 30 October 2016].
7. Dukic V.M., Lauderdale D.S., Wilder J. et al. Epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a meta-analysis. PLoS One 2013; 8: E52722.
8. Li X., Chen Y., Gao W. et al. Epidemiology and outcomes of complicated skin and soft tissue infections among inpatients in Southern China from 2008 to 2013. PLoS One 2016; 11: e0149960.

9. Sader H.S., Mendes R.E., Jones R.N., Flamm R.K. Antimicrobial susceptibility patterns of community- and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from United States Hospitals: results from the AWARE Ceftaroline Surveillance Program (2012–2014). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 86: 76–79.
10. Bassetti M., Righi E., Peghin M. et al. Is first-line antimicrobial therapy still adequate to treat MRSA in the ICU? A report from a highly endemic country. *Crit Care* 2016; 20: 246.
11. Sakonlas G., Moelering R.C. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (Suppl 5): S360–367.
12. Bassetti M., Nicco E., Mikulska M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34 (Suppl 1): S15–S19.
13. Shashindran N., Nagasundaram N., Thappa D.M., Sistla S. Can Pantone Valentine Leukocidin gene and clindamycin susceptibility serve as predictors of community origin of MRSA from skin and soft tissue infections? *J Clin Diagn Res* 2016; 10:DC01–DC04.
14. Callejo-Torre F., Eiros Bouza J.M., Olaechea Astigarraga P. et al. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation or infection in intensive care units and their reliability for predicting MRSA on ICU admission. *Infez Med* 2016; 24: 201–209.
15. Dryden M.S. Complicated skin and soft tissue infection. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 35–44.
16. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации. Под ред. Б.Р. Гельфанда. М.: 2015. / *Khirurgicheskie infekcii kozhi i mjagkikh tkanej. Rossijskie nacional'nye rekomendacii. Pod red. B.R. Gel'fanda. M.: 2015. [in Russian]*
17. Ерюхин И.А., Гельфанд Б.Р., Шляпников С.А. Хирургические инфекции. СПб.: 2003. / *Erjukhin I.A., Gel'fand B.R., Shljapnikov S.A. Khirurgicheskie infekcii. SPb.: 2003. [in Russian]*
18. DiNubile M.J., Lipsky B.A. Complicated infections of skin and skin structure infections: When infection is more than skin deep. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53: 37–50.
19. Pulgar S., Mehra M., Quintana A. et al. The epidemiology of hospitalized cases of skin and soft tissue infection in Europe. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona, Spain, 2008. Abstr. P821.
20. Kozlov R.S., Krechikova O.I., Ivanchik N.V. et al. Etiology of Nosocomial Bacterial Infections in Russia. Rosnet Study Group. Proceedings of the 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2008 Oct 25–28; Washington, DC, USA; p. 572, abst. K-4108.
21. Хачатрян Н.Н., Чупалов М.О. Послеоперационные осложнения: современный взгляд на профилактику и лечение. Хирургическая практика. 2013; 4. / *Khachatryan N.N., Chupalov M.O. Posleoperacionnye oslozhenija: sovremennij vzgljad na profilaktiku i lechenie. Khirurgicheskaja praktika. 2013; 4. [in Russian]*
22. Хирургические инфекции: практическое руководство. Под ред. И.А. Ерюхина, Б.Р. Гельфанда, С.А. Шляпникова. М.: Литтерра, 2006. / *Khirurgicheskie infekcii: prakticheskoe rukovodstvo. Pod red. I.A. Erjukhina, B.R. Gel'fanda, S.A. Shljapnikova. M.: Litterra, 2006. [in Russian]*
23. Шляпников С.А. Хирургические инфекции мягких тканей — старая проблема в новом свете. Инфекции в хирургии. 2003; 1 (1): 14–21. / *Shljapnikov S.A. Khirurgicheskie infekcii mjagkikh tkanej — staraja problema v novom svete. Infekcii v khirurgii. 2003; 1 (1): 14–21. [in Russian]*
24. Zervos M.J., Freeman K., Vo L. et al. Epidemiology and outcomes of complicated skin and soft tissue infections in hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 238–245.
25. Научный отчет о результатах исследования антибиотикорезистентности бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях с интенсивным использованием антибиотиков в стационарах России (РеВАНШ). Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии. Смоленск, 2009. / *Nauchnyj otchjot o rezultatakh issledovaniya antibiotikorezistentnosti bakterial'nykh vozбудителей nozokomial'nykh infekcij v otdelenijakh s intensivnym ispol'zovaniem antibiotikov v stacionarakh Rossii (ReVANS). Nauchno-issledovatel'skij institut antimikrobnj khimioterapii. Smolensk, 2009. [in Russian]*
26. Stevens D.L., Bisno A.L., Chambers H.F. et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft tissue Infections: 2014 Update by the Infectious Diseases Society of America. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America.
27. Schneider–Lindner V. et al. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 994–1000.
28. Гельфанд Б.Р., Белоцерковский Б.З., Милокова И.А., Гельфанд Е.Б. Эпидемиология и нозологическая структура нозокомиальных инфекций в отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара. Инфекц хирург 2014; 4: 24–36. / *Gel'fand B.R., Belocerkovskij B.Z., Miljukova I.A., Gel'fand E.B. Jepidemiologija i nozologicheskaja struktura nozokomial'nykh infekcij v otdelenii reanimacii i intensivnoj terapii mnogoprofil'nogo stacionara. Infekc khirurg 2014; 4: 24–36. [in Russian]*
29. Kolf M. et al. Economic impact of ventilator-associated pneumonia in large matched cohort. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33: 250–256.
30. Нозокомиальная пневмония у взрослых. Российские национальные рекомендации. М.: Боррес, 2009; 90. / *Nozokomial'naja pnevmonija u vzroslykh. Rossijskie nacional'nye rekomendacii. M.: Borges, 2009; 90. [in Russian]*
31. Pneumonia in adults: diagnosis and management. NICE guidelines [CG191]. Published date: December 2014.
32. Torres A., Ferrer M., Badia J. Treatment Guidelines and outcomes of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 48–53.
33. Cilloniz C. et al. Hospital-acquired pneumonia in ICU. *Int J Intensive Care* — 2013; 20 (1): 18–23.
34. Chalmers J. et al. Epidemiology, antibiotic therapy, and clinical outcomes in healthcare-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2011; 53 (2): 107–113.
35. Rello J. et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in large US database. *Chest* 2002; 122: 2115–2121.
36. Jones R.N. *Clin Infect Dis* 2010; 51 (1): 81–87.
37. Koulenti D. et al. *CCM* 2009; 37: 23–60.
38. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С. и др. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. М.: Издательский дом «М-Вести» 2014; 92. / *Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S. i dr. Klinicheskie rekomendacii po diagnostike, lecheniju i profilaktike tjazhelej vneboľ'nichnoj pnevmonii u vzroslykh. M.: Izdatel'skij dom «M-Vesti» 2014; 92. [in Russian]*
39. Macfarlane J. *Semin Respir Infect* 1994; 9: 153–165.
40. Welte T. et al. *Thorax* 2012; 67: 71–79.
41. Udeani C. et al. *Hosp Prac* 2014; 42: 109–115.
42. Torres A. et al. *Eur Respir J* 2015; 45: 1353–1363.
43. O'Grady N. P., Aleksander M., Burns L. A. et al. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Am J Infect Control* 2011; 39: 4 (Suppl 1): 1–34.
44. Abad C.L., Nasia Safdar. *Clin Rev* 2012.
45. Jean-Louis V. et al. *JAMA*. 2009; 302 (21): 2323–2329.
46. Hollenbeak S. The cost of catheter — related bloodstream infections. *J. Infusion Nursing* 2011; 34 (1): 1–110.
47. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2009; 201.
48. Ruhe J.J., Smith N., Bradsher R.W., Menon A. Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: impact of antimicrobial therapy on outcome. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 777–784.
49. Eagey K.J., Kim A., Laohavaleeson S. et al. Surgical site infections: does inadequate antibiotic therapy affect patient outcomes? *Surg Infect (Larchmt)* 2009; 10: 323–331.
50. John J., Engemann J.J. et al. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 592–598.
51. Дехнич А.В., Данилов А.И. Даптоминин: обзор фармакологических, клинических и микробиологических параметров. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2010; 12 (4). / *Dekhnich A.V., Danilov A.I. Daptomicin: obzor farmakologicheskikh, klinicheskikh i mikrobiologicheskikh parametrov. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2010; 12 (4). [in Russian]*
52. Никитин А.В. Цефтаролин фозамил — цефалоспориновый антибиотик широкого спектра действия для лечения внебольничных пневмоний и осложненных инфекций кожи и подкожной клетчатки. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 7–8. / *Nikitin A.V. Ceftarolin fozamil — cefalosporinovyj antibiotik širokogo spektra dejstva dlja lechenija vneboľ'nichnykh pnevmonij i oslozhnennykh infekcij kozhi i podkozhnoj kletchatki. Antibiotiki i khimioter 2011; 56: 7–8. [in Russian]*
53. White B., Seaton R.A. Complicated skin and soft tissue infections: literature review of evidence for experience with daptomycin. *Infect Drug Resist* 2011; 4: 115–127.
54. Locke J.B. et al. Novel Ribosomal Mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through Selection with the Oxazolidinones linezolid and Torezolid. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (12): 5265–5274.
55. Morales G., Picazo J.J., Baos E. et al. Resistance to linezolid is mediated by the CRF gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2010; 50 (6): 821–825.
56. Сухоруклова М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В. и соавт. Антибиотико-резистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2014; 16 (4): 280–286. / *Sukhorukova M.V., Skleenoeva E.Yu., Ivanчик N.V. i soavt. Antibiotiko-rezistentnost' nozokomial'nykh shtammov Staphylococcus aureus v stacionarakh Rossii: rezultaty mnogocentrovogo jepidemiologicheskogo issledovaniya MARAFON v 2011–2012 gg. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2014; 16 (4): 280–286. [in Russian]*

- Skleenova E.Ju., Ivanchik N.V. i soavt. Antibiotiko-rezistentnost' nozokomial'nykh shtammov Staphylococcus aureus v stacionarakh Rossi: rezul'taty mnogocentrovogo jepidemiologicheskogo issledovaniya MARAFON v 2011- 2012 gg. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2014; 16 (4): 280—286. [in Russian]*
57. Stevens D.L., Bisno A.L., Chambers H.F. et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. Clin Infect Dis 2005; 41: 1373—1406.
 58. Stevens D.L., Bisno A.L., Chambers H.F. et al. Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2014; 59:e10-e52; Erratum in: Clin Infect Dis 2015; 60: 1448.
 59. Iani K.M., Dryden M.S., Bhattachatyaya et al. Efficacy and safety of linezolid versus vancomycin for the treatment of complicated skin and soft tissue infections proven to be caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Surg. 2010; 199 (6): 804—816.
 60. Patrick M.F., McKay C.M. et al. Increased incidence of skin and soft tissue infections and associated antimicrobial use: a population-based study. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 6243—6249.
 61. May A.K., Stafford R.E., Bulger F.M. et al. Surgical Infection Society. Treatment of complicated skin and soft tissue infections. Surg Infect 2009; 10: 467—499.
 62. Ye Z.K., Li C., Zhai S.D. Guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: a systematic review. PLoS One 2014; 9: e99044.
 63. Brink A.J. Does resistance in severe infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* give you the 'creeps'? Curr Opin Crit Care 2012; 18: 451—459.
 64. Gonzalez-Ruiz A., Seaton R.A., Hamed K. Daptomycin: an evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections. Infect Drug Resist 2016; 9: 47—58.
 65. Eliopoulos G.M., Thauvin C., Gerson B. et al. In vitro activity and mechanism of action of A21978C1, a novel cyclic lipopeptide antibiotic. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 357—362.
 66. Hanberger H., Nilsson L.E., Maller R., Isaksson B. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca²⁺ and albumin on these drugs. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1710—1716.
 67. Schriever C.A., Fernandez C., Rodvold K.A., Danziger L.H. Daptomycin: a novel cyclic lipopeptide antimicrobial. Am J Health-Syst Pharm 2005; 62: 1145—1158.
 68. Дехнич А.В., Данилов А.И. Даптоминин: обзор фармакологических, клинических и микробиологических параметров. Клин микробиол антимикроб химиотер 2010; 12 (4). / Dekhnic A.V., Danilov A.I. Daptomicin: obzor farmakologicheskikh, klinicheskikh i mikrobiologicheskikh parametrov. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2010; 12 (4). [in Russian]
 69. White B., Seaton R.A. Complicated skin and soft tissue infections: literature review of evidence for experience with daptomycin. Infection and Drug Resistance. 2011; 4: 115—127.
 70. Arbeit R.D., Maki D., Tally F.P., Campanaro E., Eisenstein B.I. The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. Clin Infect Dis 2004; 38: 1673—1681.
 71. Nathwani D. Developments in outpatient parenteral antimicrobial therapy for Gram-positive infections in Europe, and the potential impact of daptomycin. J Antimicrob Chemotherapy. 2009; 64: 447—453.
 72. Traunmuller F., Schintler M.V., Metzler J. et al. Soft tissue and bone penetration ability of daptomycin in diabetic patients with bacterial foot infections. J Antimicrob Chemother. 2010; 65 (6): 1252—1257.
 73. Karlowsky J.A., Biedenbach D.J., Bouchillon S.K. et al. In vitro activity of Ceftaroline against bacterial pathogens isolated from patients with skin and soft tissue and respiratory tract infections in African and Middle Eastern countries: AWARE global surveillance program 2012—2014. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 86: 194—199.
 74. Matzneller P., Lackner E., Lagler H. et al. Single- and repeated-dose pharmacokinetics of ceftaroline in plasma and soft tissues of healthy volunteers for two different dosing regimens of ceftaroline fosamil. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 3617—3625.
 75. Козлов Р.С., Голуб А.В. Цефтаролин — sui generis. Клин микробиол антимикроб химиотер 2013; 15 (2): 124—130. / Kozlov R.S., Golub A.V. Ceftarolin — sui generis. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2013; 15 (2): 124—130. [in Russian]
 76. Lipsky B.A., Cannon C.M., Ramani A. et al. Ceftaroline fosamil for treatment of diabetic foot infections: the CAPTURE study experience. Diabetes Metab Res Rev 2015; 31: 395—401.
 77. Андреева И.В., Стецюк О.У., Козлов Р.С. Тигециклин: перспективы применения в клинической практике. Клин микробиол антимикроб химиотер 2010; 12 (2): 127—145. / Andreeva I.V., Stecyuk O.U., Kozlov R.S. Tigeciklin: perspektivy primeneniya v klinicheskoy praktike. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2010; 12 (2): 127—145. [in Russian]
 78. Guirao X., Sánchez García M., Bassetti M. et al. Safety and tolerability of tigecycline for the treatment of complicated skin and soft-tissue and intraabdominal infections: an analysis based on five European observational studies. J Antimicrob Chemother 2013; 68 (Suppl 2): ii37—ii44.
 79. Bergeron J., Ammirati M., Danley D. et al. Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade tet(M)- and tet(O)-mediated ribosomal protection. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40 (9): 2226—2228.
 80. Тигашил. Официальная информация о препарате компании Pfizer. <http://www.pfizer.ru/activity/?id=30&n=485>. / Tigacil. Oficial'naja informacija o preparate kompanii Pfizer. <http://www.pfizer.ru/activity/?id=30&n=485>. [in Russian]
 81. Ellis-Grosse E.J., Babinchak T., Dartois N. et al; Tigecycline 300 cSSSI Study Group; Tigecycline 305 cSSSI Study Group. The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam. Clin Infect Dis 2005; 41 (Suppl 5): S341—353.
 82. Leadbetter M.R., Adams S.M., Bazzini B. et al. Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: discovery of telavancin (TD-6424). J Antibiot (Tokyo). 2004 May; 57 (5): 326—336.
 83. Higgins D.L., Chang R., Debabov D.V., et al. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 29: 1127—1134.
 84. Дехнич А.В., Козлов Р.С., Зубарева Н.А., Попов Д.А., Романов А.В., Руднов В.А. Телаванцин — новый препарат, активный против полирезистентных грамположительных возбудителей. Клинические и микробиологические аспекты в вопросах и ответах обзор фармакологических, клинических и микробиологических параметров. Клин микробиол антимикроб химиотер 2015; 17 (2): 127—145. / Dekhnic A.V., Kozlov R.S., Zubareva N.A., Popov D.A., Romanov A.V., Rudnov V.A. Telavancin — novyj preparat, aktivnyj protiv polirezistentnykh gram-polozhitel'nykh vozбудitelej. Klinicheskie i mikrobiologicheskie aspekty v voprosakh i otvetakh obzor farmakologicheskikh, klinicheskikh i mikrobiologicheskikh parametrov. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2015; 17 (2): 127—145. [in Russian]
 85. Draghi D.C., Jones M.E., Flamm R.K., Thornsberry C., Sahm D.F. Telavancin activity against current and diverse populations of enterococci and *Streptococcus pneumoniae*. Presented at the 45th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, December 16—19, 2005, Washington, DC.
 86. Madrigal A.G., Basuino L., Chambers H.F. Efficacy of telavancin in a rabbit model of aortic valve endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3163—3165.
 87. Corey G.R., Kollef M.H., Shorr A.F. et al. Telavancin for hospital-acquired pneumonia: clinical response and 28-day survival. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 2030—2037.
 88. Dunbar L.M., Tang D.M., Manausa R.M. A review of telavancin in the treatment of complicated skin and skin structure infections (cSSSI). Therapeutics and Clinical Risk Management 2008; 4(1) 235—244.
 89. Tubau F., Fernández-Roblas R., Liñares J., Martín R., Soriano F. In vitro activity of linezolid and 11 other antimicrobials against 566 clinical isolates and comparison between NCCLS microdilution and Etest methods. J Antimicrob Chemotherapy 2001 May; 47 (5): 675—680.
 90. Bassetti M., Baguneid M., Bouza E. et al. European perspective and update on the management of complicated skin and soft tissue infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after more than 10 years of experience with linezolid. Clin Microbiol Infect 2014; 20 (Suppl 4): 3—18.
 91. Yue J., Dong B.R., Yang M. et al. Linezolid versus vancomycin for skin and soft tissue infections. Cochrane Database Syst Rev 2016; 1: CD008056.
 92. Sharpe J.N., Shively E.H., Polk H.C. Jr. Clinical and economic outcomes of oral linezolid versus intravenous vancomycin in the treatment of MRSA-complicated, lower-extremity skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Surg 2005; 189: 425—428.
 93. Rubinstein E., Isturiz R., Standiford H.C. et al. Worldwide assessment of linezolid's clinical safety and tolerability: comparator-controlled phase III studies. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1824—1831.
 94. Cattaneo D., Orlando G., Cozzi V. et al. Linezolid plasma concentrations and occurrence of drug-related haematological toxicity in patients with gram-positive infections. Int J Antimicrob Agents 2013; 41: 586—589.
 95. Go A.C., Golightly L.K., Barber G.R., Barron M.A. Linezolid interaction with serotonin reuptake inhibitors: report of two cases and incidence assessment. Drug Metabol Drug Interact 2010; 25: 41—47.
 96. Wilson D.N., Schluenzen F., Harms J.M., Starosta A.L., Connell S.R., Fucini P. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. Proc Natl Acad Sci. 2008; 105 (36): 13339—13344.
 97. Jones R.N. et al. TR-700 in vitro activity against and resistance mutation frequencies among Gram-positive pathogens. Antimicrob Chemotherapy 2009; 63: 716—720.

98. Schaadt R., Sweeney D., Shinabarger D., Zurenko G. In vitro activity of TR-700, the active ingredient of the antibacterial prodrug TR-701, a novel oxazolidinone antibacterial agent. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (8): 3236—3239.
99. Sahn D.F. et al. Results of the surveillance of Tedizolid activity and resistance program: in vitro susceptibility of gram-positive pathogens collected in 2011 and 2012 from the United States and Europe. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Feb; 81 (2): 112—118.
100. Kishen J.J., Mansour H., Unger N.R., Childs L.M. Tedizolid: a new oxazolidinone antimicrobial. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2014; 71 (8): 621—633.
101. Im W.B., Choi S.H., Park J.Y. et al. Discovery of torezolid as a novel 5-hydroxymethyl-oxazolidinone antibacterial agent. *Eur J Med Chem* 2011; 46 (4): 1027—1039.
102. Brown S.D., Traczewski M.M. Comparative *in vitro* antimicrobial activities of torezolid (TR-700), the active moiety of a new oxazolidinone, torezolid phosphate (TR-701), determination of tentative disk diffusion interpretive criteria, and quality control ranges. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (5): 2063—2069.
103. Choi S., Im W., Bartizal K. Activity of tedizolid phosphate (TR-701) in murine models of infection with penicillin-resistant and penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (9): 4713—4717.
104. Prokocimer P., Bien P., Surber J. et al. Phase 2, randomized, double-blind, dose-ranging study evaluating the safety, tolerability, population pharmacokinetics, and efficacy of oral torezolid phosphate in patients with complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (2): 583—592.
105. Moran G.J., Fang E., Corey G.R. et al. Tedizolid for 6 days versus linezolid for 10 days for acute bacterial skin and skin-structure infections (ESTABLISH-2): a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis* 2014 Jun 5. [Epub ahead of print].
106. Colca J.R., McDonald W.G., Waldon D.J. et al. Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. *J Biol Chem* 2003; 278 (24): 21972—21979.
107. Flanagan S., Fang E., Munoz K.A., Minassian S.L., Prokocimer P.G. Single- and multiple-dose pharmacokinetics and absolute bioavailability of tedizolid. *Pharmacotherapy* 2014; 34 (9): 891—900.
108. Bien P., Munoz K.A., Bohn J. et al. Human pharmacokinetics of TR-700 after ascending single oral doses of the prodrug TR-701, a novel oxazolidinone antibiotic. Poster presented at the 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, October 25—28, 2008, Washington DC.
109. Flanagan S.D., Bien P.A., Munoz K.A., Minassian S.L., Prokocimer P.G. Pharmacokinetics of tedizolid following oral administration: single and multiple dose, effect of food, and comparison of two solid forms of the prodrug. *Pharmacotherapy* 2014; 34 (3): 240—250.
110. Flanagan S., Passarelli J., Lu Q., Fiedler-Kelly J., Ludwig E., Prokocimer P. Tedizolid population pharmacokinetics, exposure response, and target attainment. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (11): 6462—6470.
111. Housman S.T., Pope J.S., Russomanno J. et al. Pulmonary disposition of tedizolid following administration of once-daily oral 200-milligram tedizolid phosphate in healthy adult volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56 (5): 2627—2634.
112. Flanagan S., Minassian S.L., Morris D. et al. Pharmacokinetics of tedizolid in subjects with renal or hepatic impairment. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (11): 6471—6476.
113. Shorr A.F., Lodise T.P., Corey G. R. et al. Analysis of the Phase 3 ESTABLISH Trials of Tedizolid versus Linezolid in Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59 (2): 864—871.
114. Flanagan S., Bartizal K., Minassian S.L. et al. *In vitro*, *in vivo*, and clinical studies of tedizolid to assess the potential for peripheral or central monoamine oxidase interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (7): 3060—3066.
115. Белькова Ю.А., Рачина С.А., Козлов Р.С., Голуб А.В., Портнягина У.С., Шамаева С.Х. Перспективы включения тедизолида в формуляр российского многопрофильного стационара для лечения осложнённых инфекций кожи и мягких тканей. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2016; 18 (3): 174—185. / Bel'kova Ju.A., Rachina S.A., Kozlov R.S., Golub A.V., Portnjagina U.S., Shamaeva S.Kh. Perspektivy vkljuchenija tedizolida v formuljar rossijskogo mnogoprofil'nogo stacionara dlja lechenija oslozhnennykh infekcij kozhi i mjagkikh tkanej. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2016; 18 (3): 174—185. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зырянов С.К. — кафедра общей и клинической фармакологии Российского университета дружбы народов, г. Москва, государственное бюджетное учреждение города Москвы «Городская клиническая больница №24 Департамента здравоохранения города Москвы»

Сычев И.Н. — кафедра общей и клинической фармакологии Российского университета дружбы народов, г. Моск-

ва, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница им. С. С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы»

Гущина Ю.Ш. — кафедра общей и клинической фармакологии Российского университета дружбы народов, г. Москва

Ятрогенные события при антибактериальной терапии (Поражение лёгких)

Л. И. ДВОРЕЦКИЙ, М. П. СУВорова, С. В. ЯКОВЛЕВ

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

Iatrogenic Events During Antibiotic Therapy (Pulmonary Disease)

L. I. DVORETSKY, M. P. SUVOROVA, S. V. YAKOVLEV

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

Антибактериальные препараты (АБП) занимают лидирующие позиции среди лекарств, вызывающих нежелательные лекарственные реакции (НЛР), в том числе в нашей стране. Особое место среди НЛР при антибактериальной терапии занимает поражение лёгких, индуцированное антибиотиками (ПЛИА), которое наименее изучено. Имеются закономерные сложности в диагностике таких осложнений антибактериальной терапии, особенно у больных с хронической бронхолёгочной патологией и получающих АБП в связи с инфекцией дыхательных путей. АБП занимают третье место (4,4%) после противоопухолевых (53%) и антиревматических (15%) лекарственных препаратов в ряду других групп лекарств, применение которых сопровождается осложнениями со стороны лёгких. Клинические варианты ПЛИА разнообразны. АБП, при которых отмечено развитие ПЛИА, представлены (в порядке уменьшения риска) нитрофуранами, даптомицином, тетрациклинами (миноциклин), цефалоспорины (цефтаролин, цефтриаксон, цефотаксим, цефепим), фторхинолонами (ципрофлоксацин, левофлоксацин). Крайне разнообразны формы ПЛИА при применении нитрофуранов (в основном нитрофурантоина) — от острой эозинофильной пневмонии (ЭП) до хронического интерстициального пневмонита и фиброза («нитрофурановое лёгкое»). ПЛИА на фоне применения липопептидного АБП даптомицина хорошо изучены и клинически представлены ЭП с благоприятным исходом после отмены препарата и назначения глюкокортикоидов; риск развития ПЛИА прямо зависит от суммарной дозы даптомицина. Многочисленные клинические варианты ПЛИА отмечены при применении тетрациклинов (преимущественно миноциклина, в меньшей степени доксициклина): ЭП, облитерирующий бронхиолит с организующейся пневмонией, плеврит, перикардит. При применении некоторых цефалоспориновых антибиотиков (цефотаксим, цефтриаксон, цефепим, цефтаролин) отмечено развитие ЭП, а также гиперчувствительного пневмонита; развитие последнего связано с генетической предрасположенностью, так как встречается преимущественно у жителей Японии. Крайне редкие случаи ПЛИА на фоне фторхинолонов (ципрофлоксацин, левофлоксацин) представлены гиперчувствительным пневмонитом. Согласно классификации НЛР, большинство ПЛИА относится к реакциям типа В (непредсказуемые, дозозависимые, не связанные с фармакологическим действием); в то же время поражение лёгких на фоне даптомицина можно отнести к реакциям типа С (связь с кумуляцией и дозой препарата, но не связанные с фармакологическим действием). Следующие клинические данные позволяют заподозрить ПЛИА у пациента, получающего АБП: лечение АБП, для которых возможно развитие поражения лёгких; появление лёгочной симптоматики у пациента, получающего АБП в связи с инфекцией другой локализации, или усугубление лёгочной симптоматики, несмотря на проведение адекватной антибактериальной терапии; двусторонний и интерстициальный характер лёгочных поражений и наличие системных проявлений; эозинофилия крови и БАЛ. Для диагностики ПЛИА рекомендовано проведение компьютерной томографии высокого разрешения, исследование эозинофилов в крови в динамике, цитология БАЛ, в особо сложных ситуациях — прицельная тонкоигольная биопсия лёгкого.

Ключевые слова: антибактериальная терапия, нежелательные реакции, поражение лёгких.

Antibiotics occupy a leading position among drugs that cause adverse drug reaction (ADR), in Russia as well. Drug-induced pulmonary disease (DIPD), which is the least studied, takes a special place among ADR in antibiotic therapy. There are difficulties in diagnosing such complications of antibiotic therapy, especially in patients with chronic bronchopulmonary pathology and receiving antibiotics due to an infection of the respiratory tract. Antibiotics occupy the third place (4.4%), after antitumor (53%) and antirheumatic (15%) drugs, among other groups of drugs that cause lung damage. Clinical options for DIPD are diverse. Antibiotics, which cause DIPD, are represented (in order of descending risk) by nitrofurans, daptomycin, tetracyclines (minocycline), cephalosporins (ceftaroline, ceftriaxone, cefotaxime, cefepime), fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin). The forms of DIPD are extremely diverse when using nitrofurans (mainly nitrofurantoin) — from acute eosinophilic pneumonia (EP) to chronic interstitial pneumonitis and fibrosis («nitrofurantoin lung»). DIPD during treatment with lipopeptide antibiotic daptomycin are well studied and are clinically presented by EP with a favorable outcome after discontinuation of the drug and the appointment of glucocorticoids; the risk of DIPD development directly depends on the total dose of daptomycin. Numerous clinical variants of DIPD have been observed with the use of tetracyclines (mainly minocycline, to a lesser extent doxycycline): EP, obliterating bronchiolitis with organizing pneumo-

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 119991 г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. ПМГМУ им. И. М. Сеченова

nia, pleurisy, pericarditis. With the use of certain cephalosporin antibiotics (cefotaxime, ceftriaxone, cefepime, ceftazidime), development of EP and hypersensitive pneumonitis has been noted; the development of the latter is associated with a genetic predisposition, since it is found predominantly among the inhabitants of Japan. Extremely rare cases of DIPD due to fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin) are represented by hypersensitive pneumonitis. According to the classification of ADR, most DIPD belong to type B reactions (unpredictable, dose-independent, unrelated to pharmacological action); at the same time, lung damage due to daptomycin can be attributed to type C reactions (association with cumulation and dose of the drug, but not related to pharmacological action). The following clinical data allow to suspect DIPD in a patient receiving antibiotics: antimicrobial treatment, for which the development of lung damage is possible; the appearance of pulmonary symptoms in a patient receiving antibiotics due to infection of other localization, or exacerbation of pulmonary symptoms, despite the conduct of adequate antibiotic therapy; bilateral and interstitial nature of pulmonary lesions and the presence of systemic manifestations; eosinophilia of blood and BAL fluid. For the diagnosis of DIPD, a high-resolution CT scan, a dynamic study of eosinophils in the blood, a cytology of BAL fluid, and, in particularly difficult situations, a targeted fine needle biopsy of the lung are recommended.

Keywords: *antibacterial therapy, adverse reactions, pulmonary disease.*

Всякая лекарственная терапия таит в себе потенциальный риск нежелательных лекарственных реакций (НЛР), являющихся ятрогенным событием со всеми вытекающими последствиями (клиническими, экономическими, юридическими и др.). Под термином лекарственные ятрогении понимают любые неблагоприятные или вредные для организма человека реакции, возникающие при назначении врачом лекарственных препаратов (ЛП) независимо от адекватности их назначения.

Одним из проявлений НЛР являются поражения лёгких, являющихся клинической мишенью для более 380 медикаментов, которые могут приводить к развитию пневмопатий, хотя их истинная частота остается неизвестной [1, 2].

Частоту и распространённость лекарственно-индуцированных поражений лёгких оценить сложно из-за трудностей диагностики и часто малосимптомного течения заболевания; некоторые данные свидетельствуют о достаточной распространённости этой патологии (до 5% в общей структуре внегоспитальной заболеваемости) [3]. Наиболее точно частоту лекарственно-индуцированных поражений лёгких можно оценить при анализе данных мониторинга безопасности конкретных ЛП.

Характер поражений лёгких (ПЛ), вызванных ЛП, разнообразен и представлен различными клинико-рентгенологическими вариантами, в основе которых лежит соответствующая морфологическая картина [4].

Одной из наиболее широко применяемых в клинической практике групп лекарственных средств являются антибактериальные препараты (АБП), доля которых достигает 70% от всех назначаемых в стационаре ЛП [5]. По данным большинства исследований и спонтанных сообщений, АБП занимают лидирующие позиции среди ЛП, вызывающих НЛР, в том числе в нашей стране [6].

НЛР на фоне назначения АБП развиваются со стороны практически всех органов и систем, что проявляется в виде соответствующих морфологи-

ческих и функциональных нарушений. Особое место среди НЛР при антибактериальной терапии занимает ПЛ, индуцированные антибиотиками (ПЛИА). Это обусловлено прежде всего тем, что в большинстве случаев АБП назначаются больным с бронхолёгочными инфекциями (пневмония, обострение ХОБЛ и др.).

Эпидемиология поражения лёгких, индуцированного антибиотиками

Эпидемиологические данные о ПЛИА довольно скудны по ряду причин, среди которых можно выделить следующие:

- трудности верификации лекарственной природы пневмопатии и этиологической роли конкретного АБП в развитии ПЛ, особенно у больных с исходной или хронической лёгочной патологией;
- недостаточная информативность обычной рентгенографии лёгких по сравнению с компьютерной томографией высокого разрешения;
- отсутствие или недостаточное использование инвазивных диагностических методов исследования (цитологическое исследование БАЛ, биопсия лёгких и др.);
- недостаточное знакомство врачей общей практики и различных специалистов с проблемой лекарственных пневмопатий, в том числе и ПЛИА;
- отсутствие информирования соответствующих органов фармаконадзора о достоверных или вероятных случаях развития ПЛИА.

По данным сообщений о развитии ПЛ, вызываемых различными ЛП, частота ПЛИА была относительно стабильной на протяжении 6-летнего периода с 2004 по 2009 гг. (56—70 случаев ежегодно) (таблица). Примечательно, что АБП занимали третье место (4,4%) после противоопухолевых препаратов (53%) и антиревматических (биологических и небиологических) ЛП (15%) среди других групп ЛП, вызывающих ПЛ [4].

Первым описанием ПЛИА считается сообщение, касающееся 19-летней пациентки, у которой

Сообщения о подозреваемых лекарственных интерстициальных поражениях лёгких в период 2004—2009 гг. [4]

Группы ЛП	Количество регистрируемых случаев ПЛ по годам					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Противоопухолевые (нетаргетные)	322	339	355	388	399	393
Противоопухолевые (таргетные)	348	236	174	197	417	341
Препараты золота	1	3	3	3	1	2
Антибактериальные и противогрибковые	68	70	69	56	64	61
Китайские растительные препараты	36	47	36	32	33	49
Препараты интерферона	34	63	80	50	45	49
Антиревматические небиологические	175	150	136	122	107	91
Антиревматические биологические	16	48	59	49	64	94
Противовоспалительные анальгетики	28	36	19	33	29	25
Психотропные препараты	21	14	31	15	18	13
Гипотензивные препараты	28	32	38	43	50	46
Прочие	167	154	161	172	232	218
Всего	1244	1192	1161	1160	1459	1382

через 6 дней после назначения сульфадиметоксина (Мадрибон) по поводу *acne vulgaris* появился непродуктивный кашель, стали выслушиваться хрипы и шум трения плевры, рентгенологически выявлена лёгочная инфильтрация, а в крови — увеличение количества эозинофилов. В лёгочном биоптате обнаружилась инфильтрация эозинофилами [7]. В этой статье приведена ссылка на более раннее сообщение об эозинофильной пневмонии, развившейся у больной после употребления вагинального крема, содержащего сульфаниламиды [8]. Возможно, что именно это сообщение можно считать первым описанием ПЛИА, однако лёгочная биопсия не проводилась, что не позволило верифицировать эозинофильную инфильтрацию лёгкого. В дальнейшем было описано два случая хронической эозинофильной пневмонии после назначения сульфаниламидов [9].

Случаи развития лёгочных инфильтратов с эозинофилией крови, не связанных с паразитарными инфекциями и аллергическими реакциями, стали обозначать как синдром лёгочной инфильтрации с эозинофилией, описанной в свое время швейцарским врачом Вильгельмом Леффлером [10] и фигурировавшей длительное время под именем синдрома Леффлера. Примечательно, что сам В. Леффлер описал синдром «лёгочной эозинофилии» у больных с паразитарной инфекцией (аскаридоз и др.). В настоящее время среди лёгочных эозинофилий принято различать острую эозинофильную пневмонию (транзиторную и прогрессирующую) и хроническую лёгочную эозинофилию.

По мере появления в клинической практике новых АБП стали публиковаться сообщения о ПЛ, связанных с назначением различных классов АБП. К настоящему времени в литературе имеется клиническое досье в виде многочисленных сообщений о ПЛИА с различной степенью доказательств «виновности» конкретного (подозреваемого) АБП в развитии пневмопатии. Среди АБП основное место принадлежит нитрофуранам, тетрациклинам, цефалоспорином различных поколений (преимущественно новых генераций), дап-

томицину. Значительно меньше сообщений о «фторхинолоновых и макролидных пневмопатиях», а случаи ПЛ на фоне применения пенициллинов практически отсутствуют, хотя в обзорных статьях указанные АБП упоминаются в качестве возможных причин ПЛ [11—12].

Нитрофураны

Нитрофурановые препараты используются главным образом для лечения инфекций мочевыводящих путей. Одними из ятрогенных событий на фоне применения нитрофуранов являются ПЛ, первые сообщения о которых публиковались вскоре после появления этой группы АБП в клинической практике [13]. Наибольшее число публикаций касается ПЛ при лечении нитрофурантоином (фурадонин), который в настоящее время является, наряду с фуразидином (фурагин, фурамаг), основным препаратом группы нитрофуранов, применяемым в лечении инфекций мочевыводящих путей. В 80 годах прошлого столетия Шведским комитетом по регистрации побочных эффектов лекарственной терапии было сообщено о 921 случае НЛР, зарегистрированных за 10-летний период (1966—1976 гг.) при применении нитрофурантоина. Наиболее частыми НЛР (43%) были «острые лёгочные синдромы», реже развивалась хроническая патология («интерстициальный пневмонит»). Авторы уже тогда призвали пересмотреть клиническое значение нитрофуранов в лечении мочевых инфекций с учётом риска развития НЛР со стороны лёгких [14]. Пневмопатия является класс-специфическим осложнением лечения нитрофурантоином, о чём указано в инструкции по применению данного препарата.

Частота ПЛ при лечении нитрофурантоином составляет 1/100000 [15]. Особенностью ПЛ на фоне лечения нитрофуранами является развитие острых и хронических пневмопатий [16]. Острые эпизоды в виде эозинофильной пневмонии возникают в пределах месяца от начала терапии и характеризуются лихорадкой, кашлем, появлением лёгочных инфильтратов и часто эозинофи-

лией крови [17]. После отмены препарата происходит обратное развитие клинко-рентгенологических симптомов в течение 2 нед. При хронических формах симптоматика проявляется не ранее, чем через 6 мес после начала терапии нитрофурантоином [18–20]. В случае продолжения терапии нитрофурантоином возможно развитие лёгочного фиброза [21], клинические признаки которого могут манифестироваться в более поздние сроки — от двух месяцев до 5 лет после окончания лечения АБП [22]. Именно для хронических форм ПЛ (интерстициальный лёгочный фиброз) было введено понятие «нитрофурановое лёгкое». Распространенность «нитрофуранового лёгкого» значительно снизилась к 1980 гг. по сравнению с 1960 гг. Однако в связи с широким использованием этого класса препаратов в урологии, «нитрофурановое» лёгкое сохраняет свою клиническую значимость до настоящего времени.

К факторам риска ПЛ на фоне терапии нитрофуранами принято относить наличие у больных лёгочной патологии (бронхиальная астма, ХОБЛ), снижение клубочковой фильтрации почек (ниже 60 мл/мин), длительность лечения, пожилой возраст.

Основными лёгочными синдромами при лечении нитрофуранами являются: эозинофильная пневмония, организуемая пневмония с бронхиолитом, интерстициальный фиброз [22–23].

В основе нитрофурантоин-индуцированных пневмопатий лежат различные механизмы. Если при острых формах развивается иммуноопосредованное воспаление, часто в сочетании с эозинофилией крови (острые эозинофильные пневмонии), то хронические формы обусловлены токсическим влиянием кислородных радикалов, продуцируемых нитрофуранами [24].

Тетрациклины

О развитии «тетрациклиновых пневмопатий» сообщалось ещё во второй половине XX столетия [25]. Спустя три десятилетия описан более тяжёлый случай ПЛ с дыхательной недостаточностью, сопровождавшийся внелёгочными проявлениями (лимфаденопатия, гепатит, нефрит) у 20-летней женщины, получавшей доксициклин по поводу *acne vulgaris* [26].

В последние годы «тетрациклиновые пневмопатии» описывались главным образом при применении миноциклина — полусинтетического антибиотика из группы тетрациклинов, относящегося, как и доксициклин, к тетрациклинам длительного действия. Молекула миноциклина, в сравнении с другими тетрациклинами, характеризуется наиболее выраженными липофильными свойствами, что обуславливает его отличия в фармакокинетике от остальных препаратов данной группы.

Основной формой «миноциклиновой пневмопатии» является острая эозинофильная пневмония [27–32]. К 2015 г. насчитывалось 26 случаев ПЛ, вызванных миноциклином и трактовавшихся, по данным клинко-лабораторного исследования, как острая эозинофильная пневмония [33]. Клиническая симптоматика характеризовалась одышкой, лихорадкой через несколько дней после назначения миноциклина, эозинофилией крови и в БАЛ. Рентгенологически выявлялась лёгочная инфильтрация. Течение было благоприятным, летальных случаев не зарегистрировано. Симптоматика регрессировала после отмены миноциклина и назначения глюкокортикоидов (11 больных). У одного пациента потребовалась ИВЛ в течение 5 дней.

Японские авторы сообщили о редкой форме ПЛИА у больной, получавшей миноциклин в течение 5 мес по поводу *acne vulgaris*. Рентгенологически выявлялись округлые тени в обоих лёгких. В БАЛ обнаружено повышенное количество лимфоцитов. По данным исследования лёгочного биоптата, полученного при трансбронхиальной биопсии, морфологическая картина трактовалась как облитерирующий бронхиолит с организуемой пневмонией [34]. Специального лечения не требовалось и после отмены миноциклина рентгенологическая картина лёгких нормализовалась.

В нескольких сообщениях представлены случаи ПЛ, сопровождавшиеся плевральным выпотом и перикардитом [35–37]. Плеврит в этих случаях может расцениваться как парапневмонический (экссудат, по данным исследования), либо являться проявлением системной реакции немедленной гиперчувствительности на миноциклин. В пользу последнего предположения может свидетельствовать положительный кожный тест на миноциклин, повышение содержания эозинофилов и уровня IgE в крови у одной из описанных пациенток [38], а также ранее не описанные внелёгочные проявления в виде функциональных нарушений печени, эозинофильной инфильтрации костного мозга у больного с положительным тестом ингибиции миграции макрофагов под влиянием миноциклина [38].

При эозинофильной пневмонии, вызванной миноциклином, могут обнаруживаться эозинофильные инфильтраты на бронхиальных слизистых, представленных белесоватыми образованиями, характер которых был верифицирован морфологически с высоким содержанием эозинофилов у больной, получавшей миноциклин в течение 9 дней по поводу инфекции мочевыводящих путей [39].

Цефалоспорины

Уже в конце XX века в литературе публикуются описания случаев «лёгочной эозинофилии» при

лечении цефалоспоридами [40]. Эозинофильные синдромы, в том числе и лёгочные эозинофилии возникают среди больных, леченных цефалоспоридами, приблизительно у 8% [41, 42].

Сообщается о 50-летнем больном, у которого на фоне применения цефтриаксона по поводу менингита в течение 3 нед развилась лихорадка, артралгии, миалгии, кожные высыпания, отёк лица. В крови обнаружено повышение количества эозинофилов и атипичные лимфоциты. После отмены цефтриаксона и назначения преднизолона клиническая симптоматика регрессировала. Авторы настаивают на приоритете описания подобного симптомокомплекса (DRESS-синдром) на фоне применения цефтриаксона [43].

За последнее время опубликован ряд сообщений о развитии эозинофильной пневмонии при лечении цефалоспоридами нового поколения, в частности цефтаролином [44]. Цефтаролин — антибиотик класса цефалоспоринов нового, V поколения с активностью в отношении MRSA. После в/в введения пролекарство цефтаролина фосамил быстро превращается в активный цефтаролин. В исследованиях *in vitro* показано бактерицидное действие цефтаролина, обусловленное ингибированием биосинтеза клеточной стенки бактерий за счёт связывания с пенициллинсвязывающими белками. Цефтаролин проявляет бактерицидную активность в отношении метициллинорезистентного стафилококка (MRSA) и пневмококков, устойчивых к пенициллинам, цефалоспоридам и макролидам, в связи с его высоким сродством к измененным пенициллинсвязывающим белкам этих микроорганизмов.

Описан случай эозинофильной пневмонии у больного, получавшего цефтаролин по поводу стафилококковой пневмонии, вызванной MRSA. Подозрение на лекарственную патологию лёгких было обусловлено усилением признаков дыхательной недостаточности, эозинофилией в крови и БАЛ до 40 и 13%, соответственно, после назначения цефтаролина. Отмена цефтаролина, наряду с назначением ванкомицина и метилпреднизолона, способствовала положительной клинко-рентгенологической динамике и нормализации количества эозинофилов в крови и БАЛ [45]. Среди 31 больных, получавших длительное лечение цефтаролином по поводу инфекций, вызванных MRSA, наиболее частыми НЛР были эозинофильная пневмония, кожная сыпь, диарея [46].

Имеются сообщения о развитии гиперчувствительных пневмонитов, вызванных цефалоспоридами у японцев [47, 48]. Гиперчувствительный пневмонит представляет собой сложный клинко-рентгенологический синдром, в основе которого лежит иммунокомп-

лексный процесс с развитием лимфоцитарного альвеолита, а при хроническом течении — лёгочного фиброза. Этиологическими факторами могут быть различные антигенные воздействия, в том числе и ЛП [49]. Определённое значение имеет генетическая предрасположенность к развитию гиперчувствительного пневмонита [50], а также химическая структура цефалоспоринов. Реакции гиперчувствительности на цефалоспорины могут быть обусловлены как самим бета-лактамым кольцом, так и боковыми цепями [51]. О роли боковых цепей молекулы цефалоспоринов в развитии гиперчувствительной пневмонии может свидетельствовать сообщение о 54-летнем пациенте, которому по поводу лихорадки, кашля и ринореи были назначены цефтриаксон и кларитромицин (!). В связи с ухудшением состояния (одышка, инфильтрация в лёгких), пациент был госпитализирован в тяжёлом состоянии (гипоксия, лейкоцитоз, изменения на КТ в виде «матового стекла», внутригрудной лимфоаденопатии), был назначен цефепим с левофлоксацином. В связи с отсутствием эффекта в течение 6 дней и отрицательными результатами на наличие атипичной микрофлоры назначен меропенем в комбинации с ципрофлоксацином. С учётом положительного клинко-рентгенологического эффекта проведена деэскалация антибактериальной терапии и начато лечение цефтазидимом с левофлоксацином. Во время лечения вместо цефтазидима был ошибочно введен цефотаксим, после чего у больного возникла рвота, лихорадка, одышка, ухудшение рентгенологической картины в лёгких. В БАЛ выявлен лимфоцитоз (23%), повышение содержания нейтрофилов и эозинофилов (10 и 17%, соответственно), снижение соотношения CD4/CD8. После отмены цефотаксима отмечена положительная динамика. Год спустя больному был назначен цефтриаксон в сочетании с аминогликозидом по поводу инфекции верхних дыхательных путей, после чего выявлена лёгочная инфильтрация с развитием дыхательной недостаточности, потребовавшая ИВЛ. Диагностирован гиперчувствительный пневмонит, вызванный цефтриаксоном. Примечательно, что у описанного больного клинко-рентгенологические признаки гиперчувствительного пневмонита возникали при назначении цефтриаксона, цефепима, цефотаксима, в то время как цефтазидим не вызывал симптомов ПЛ. Авторы полагают, что цефотаксим, цефтриаксон, цефепим и цефуроксим имеют, в отличие от цефтазидима, идентичную боковую цепь R1. [52]. Однако ранее был описан случай гиперчувствительного пневмонита, вызванного цефтазидимом [53].

Фторхинолоны и макролиды

Реакции гиперчувствительности на фторхинолоны возникают редко (приблизительно 1/50000) [54]. Принято считать, что возникновение НЛР связано с молекулярной структурой препаратов этого класса. Сообщается о двух случаях гиперчувствительного пневмонита у 82-летнего пациента, получавшего ципрофлоксацин и левофлоксацин по поводу дивертикулита и у 52-летней больной острым бронхитом, леченной ципрофлоксацином [55]. Заслуживает внимания сообщение о 68-летней пациентке, у которой можно проследить целый каскад ятрогенных событий. После операции по поводу хронической субдуральной гематомы у больной развилась инфекция мочевыводящих путей, в связи с чем назначен ципрофлоксацин. Через шесть дней после назначения АБП возникла лихорадка, одышка, гипоксемия, отмечено повышение уровня СРБ в крови. Рентгенологически выявлены интерстициальные изменения в лёгких, расцененные как бактериальная пневмония, по поводу чего назначен амоксициллин/клавуланат. Отсутствие эффекта от назначенного АБП и прогрессирование процесса в лёгких, наряду с повышением количества лимфоцитов в БАЛ, позволили предположить неинфекционную (лекарственную) природу ПЛ. При открытой биопсии лёгкого выявлена морфологическая картина гиперчувствительного пневмонита (лимфоплазмозитарная инфильтрация с повышенным количеством эозинофилов и гигантоклеточными грануломами). После назначения глюкокортикоидов отмечено регрессирование клинико-рентгенологических признаков ПЛ [56].

Что касается макролидов, то в литературе удалось найти лишь одно сообщение о развитии эозинофильной пневмонии на фоне лечения рокситромином [57].

Даптомицин

За последнее десятилетие было опубликовано значительное количество сообщений о лекарственных пневмопатиях, вызываемых даптомицином, превысившее описания случаев пневмопатий вследствие других АБП. Даптомицин является антибиотиком класса липопептидов, обладающим высокой активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, прежде всего стафилококка. Показаниями к назначению препарата являются инфекции кожи и мягких тканей, бактериемия и инфекционный эндокардит, а также инфекции имплантатов (кардиоимпланты, суставные протезы и др.). Примечательно, что даптомицин не может быть использован для лечения пневмонии, поскольку разрушается лёгочным сурфактантом.

Наиболее частой ятрогенной пневмопатией на фоне применения даптомицина является эозинофильная пневмония [58–62].

В одной из публикаций [63] сообщалось более чем о 40 пациентах, наблюдавшихся на протяжении 7 лет с верифицированной (7), вероятной (13) и возможной (38) эозинофильной пневмонией, вызванной даптомицином. Возраст больных колебался от 60 до 87 лет, доза даптомицина составляла от 4,4 до 8,0 мг/кг/день, а признаки развития эозинофильной пневмонии наблюдались в сроки от 10 дней до 4 нед после начала антибиотикотерапии.

Обращает внимание рост случаев эозинофильной пневмонии среди госпитализированных больных за период 2004–2010 годов. У большинства больных сообщалось о повышении количества эозинофилов в крови и БАЛ, однако известны случаи даптомицин-индуцированной эозинофильной пневмонии без эозинофилии крови [64]. В другой публикации, наряду с описанием двух собственных наблюдений, сообщается о 22 других случаях эозинофильной пневмонии на фоне лечения даптомицином [65]. У большинства пациентов отмена даптомицина и назначение глюкокортикоидов способствовали регрессу клинико-рентгенологической симптоматики, за исключением нескольких случаев затяжного течения эозинофильной пневмонии и необходимости в длительной терапии глюкокортикоидами [66].

Механизмы развития ПЛИА

Согласно классификации НЛР, большинство ПЛИА относятся к типу В, составляющему не более 20% всех НЛР, и являются непредсказуемыми, не связанными с фармакологическим действием ЛП. ПЛИА реализуются иммунологическими механизмами, что может объяснять характер клинической симптоматики, обусловленной активацией цитокиновых реакций (лихорадка, кожная сыпь, эозинофилия в крови и лёгочной ткани, а также эффект от назначения глюкокортикоидов). Механизмы даптомицин-индуцированной пневмопатии остаются окончательно неясными. Возможно, что имеет значение большая длительность применения даптомицина, в отличие от других АБП, и, следовательно, накопление дозы. С учётом этого правомочно относить данный вид НЛР к типу «С» (связь с кумуляцией и дозой препарата). Накопление даптомицина в лёгочном сурфактанте создаёт высокие концентрации антибиотика в альвеолах и вызывает их повреждение. В то же время эозинофильная реакция лёгочной ткани свидетельствует о роли иммунологических механизмов, как это имеет место при ятрогенных эозинофильных пневмониях на фоне лечения цефалоспорином.

В развитии лекарственных пневмопатий могут иметь значение генетические факторы. О расовой/этнической предрасположенности к лекарственным пневмопатиям могут свидетельствовать эпидемиологические данные. Так, при применении блеомицина в дозе около 200 мг частота ПЛ среди

японцев и европейцев составляла 0,66% и 0,01% соответственно (различие достоверно). ПЛ, индуцированные противоопухолевым таргетным препаратом гефитинибом, возникают у японцев в 13 раз чаще, чем среди жителей США, а лефлунамид вызывает ПЛ у японцев и у лиц других приморских территорий в 1,81 и 0,017%, соответственно [66]. Кроме того, лекарственные ПЛ у японцев характеризуются особенностями течения (высокая летальность, частые обострения ИЛФ и др.).

Диагностика ПЛИА

Распознавание ПЛИА в ситуациях, когда АБП назначается по поводу внелёгочных инфекций (мочеполовой тракт, инфекции кожи и мягких тканей и др.), вызывает меньше сложностей, поскольку возникновение клинико-рентгенологических признаков лёгочной патологии на фоне назначения АБП требует в первую очередь исключения ПЛИА.

С учётом трудностей диагностики ПЛ, вызываемых АБП, оценивали диагностическое значение мультidetекторной компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии и характер лёгочной патологии у 43 больных с интерстициальным заболеванием лёгких, вызванным АБП, назначаемых по поводу пиелонефрита (27), инфекций костей (12) и пансинусита (4). Возраст больных колебался от 15 до 46 лет. В 18 случаях проводилась тонкоигольная биопсия лёгкого под контролем мультidetекторной компьютерной томографии или УЗИ, позволившая выявить три группы лёгочных изменений: бронхиолит; бронхоэктазы и пневмонит; кистозный фиброз и альвеолярный некроз [68].

Особые трудности верификации лекарственной природы ПЛ возникают в случаях, когда первоначально назначенный АБП по поводу пневмонии, обострения хронического бронхита или острого бронхита становится виновным в развитии принципиально другого патологического процесса в лёгких. При этом отсутствие ожидаемого эффекта или ухудшение состояния трактуется, в первую очередь, как неэффективность первоначального АБП и служит поводом к назначению нового антибиотика. Дальнейшее развитие клинических событий происходит в разных направлениях (дифференциальная диагностика, сомнение в правильности первоначального диагноза, назначение очередного АБП и др.). Если учесть, что каждый из назначаемых АБП может быть потенциально пневмотоксичным, то риск ПЛИА неизбежно возрастает, а трудности ведения таких пациентов становятся всё более очевидными.

При назначении АБП больным с лёгочными инфекциями (пневмония, обострение хронического бронхита, острый бронхит и др.) могут возникать следующие ситуации, диктующие, в зави-

симости от их трактовки, принятие соответствующих решений:

- Стойкий клинический эффект антибактериальной терапии предполагает продолжение лечения в соответствии с имеющимися рекомендациями.

- При отсутствии клинического эффекта (сохранение лёгочной симптоматики, лихорадки) в течение 48–72 ч после назначения АБП причина, как правило, связана с отсутствием лёгочной инфекции, либо (чаще) назначением неадекватного АБП. С учётом этого, у данной категории пациентов необходимо исключить синдромно-сходные заболевания (туберкулёз, опухолевый процесс, интерстициальный фиброз лёгких и др.), а в случае их отсутствия произвести смену антибиотика.

- Ухудшение состояния в виде прогрессирования лёгочного процесса (по данным рентгенологического исследования), развитие дыхательной недостаточности, нарастание системной воспалительной реакции. В подобной ситуации сохраняется вероятность неадекватного АБП и наличие синдромно-сходного с пневмонией заболевания (лёгочный васкулит и др.). Наряду с этими причинами ухудшения состояния пациента, может рассматриваться вопрос о возможности развития ПЛИА, что требует проведения соответствующих дополнительных исследований (КТ высокого разрешения, БАЛ, динамика количества эозинофилов в крови, иммунологические исследования и др.).

- Ухудшение состояния после временного улучшения и ослабления клинической симптоматики в виде появления новой рентгенологической картины даёт основание заподозрить ПЛИА.

С целью диагностики ПЛИА следует ориентироваться на следующие критерии:

- указание на применение АБП, которые могут вызывать ПЛ;
- исключение других причин имеющихся клинических проявлений;
- клинико-рентгенологическое улучшение после отмены подозреваемого АБП;
- ухудшение клинической симптоматики и отрицательная рентгенологическая динамика после возобновления приёма отменённого АБП;
- результаты дополнительных исследований (цитологическое исследование БАЛ, КТ лёгких высокого разрешения, эозинофилия крови, реакция бласттрансформации лимфоцитов под влиянием подозреваемого АБП, морфологическая картина лёгочного биоптата).

Заключение

ПЛИА является реальным ятрогенным событием при проведении антибактериальной терапии. Это касается, прежде всего, таких АБП как нитро-

фураны, тетрациклины, цефалоспорины, даптомицин, значительно реже — фторхинолоны и макролиды. Основными морфологическими вариантами ПЛИА являются эозинофильная пневмония, гиперчувствительный пневмонит и некоторые другие. Клинические проявления заболевания являются неспецифичными. Появление новой волны клини-

ческой симптоматики (лихорадка, дыхательная недостаточность, эозинофилия крови), наряду с изменениями рентгенологической картины лёгких, должно настораживать врача в отношении ПЛИА и служить поводом для проведения дополнительных исследований, отмены подозреваемого АБП, а в ряде случаев — назначения глюкокортикоидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Camus P., Bonniaud P., Fanton A., Camus C., Baudaun N., Foucher P. Drug-induced and iatrogenic lung disease. Clin Chest Med 2004; 25 (3): 479—519.
- Flieder D., Travis W. Pathologic characteristics of drug-induced lung disease. Clin Chest Med 2004; 25: 37—45.
- Camus P., Kudoh S., Ebina M. Interstitial lung disease associated with drug therapy. Br J Cancer 2004; 91: Suppl 2: S18—23.
- Kubo K., Azuma A., Kanazawa M. et al. Consensus statement for the diagnosis and treatment of drug-induced lung injuries. Respiratory Investigation, 2013; 51 (4): 260—277.
- Зырянов С.К., Галеева Ж.А., Белоусов Ю.Б. Пробиотики, пребиотики и антибиотик-ассоциированная диарея: правда и мифы. Практическая пульмонология. 2015; 2: 38—40. / Zyrjanov S.K., Galeeva Zh.A., Belousov Ju.B. Probiotiki, prebiotiki i antibiotik-associirovannaja diareja: pravda i mify. Prakticheskaja pul'monologija. 2015; 2: 38—40. [in Russian]
- Стуров Н.В. Сравнительный анализ эффективности методов выявления неблагоприятных побочных реакций на лекарственные средства в Российской Федерации в современных условиях. Автореф. дисс.канд. М.: 2009. / Sturov N.V. Sravnitel'nyj analiz jeffektivnosti metodov vyjavlenija neblagoprijatnykh pobochnykh reakcij na lekarstvennye sredstva v Rossijskoj Federacii v sovremennykh uslovyjakh. Avtoref. diss.kand. M.: 2009. [in Russian]
- Fiegenberg D.S., Weiss H., Kirshman H. Migratory Pneumonia With Eosinophilia Associated With Sulfonamide. Arch Intern Med. 1967; 120 (1): 85—89.
- Klinghoffer J.F. Löffler's syndrome following use of vaginal cream. Ann Intern Med 1954; 40: 343.
- Feinmann L. Drug-induced lung disease: pulmonary eosinophilia and sulphonamides. Proc R Soc Med 1975; 68: 20—22.
- Löffler W. Zur Differential-Diagnose der Lungeninfiltrationen. I. Frühfiltrate unter besonderer Berücksichtigung der Rückbildungszeiten. Beiträge zum Klinik der Tuberkulose 1932; 79: 338—367.
- Dreis D.F., Winterbauer R.H., Van Norman G.A. et al. Cephalosporin-induced interstitial pneumonitis. Chest 1984; 86 (1): 138—40.
- Cleverley J.R., Screaton N.J., Hiorns M.P. et al. Drug-induced lung disease: high-resolution CT and histological findings. Clin Radiol 2002; 57 (4): 292—299.
- Israel H.L., Diamond P. Recurrent pulmonary infiltration and pleural effusion due to nitrofurantoin sensitivity. N Engl J Med 1962; 266: 1024—1026.
- Holmberg L., Boman G., Böttiger L.E. et al. Adverse reactions to nitrofurantoin. Analysis of 921 reports. Am J Med 1980; 69 (5): 733—738.
- Hooper D.C. Urinary tract agents: nitrofurantoin and methenamine. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005; 423—428.
- Sovijarvi A.R.A., Lemola M., Stenius B., Idanpaan-Heikkilä J. Nitrofurantoin induced acute, subacute and chronic pulmonary reactions. A report of 66 cases. Scand J Resp Dis 1977; 58: 41—50.
- Lopez M., Salvaggio J.E. Eosinophilic pneumonias. Immunol Allergy Clin North Am 1992; 12: 349—363.
- Bhullar S., Lele S.M., Kraman S. Severe nitrofurantoin lung disease resolving without the use of steroids. J Postgrad Med 2007; 53: 111—113.
- Williams E.M., Triller D.M. Recurrent acute nitrofurantoin-induced pulmonary toxicity. Pharmacotherapy 2006; 26: 713—718.
- Martins R.R., Marchiori E., Viana S.L. et al. Chronic eosinophilic pneumonia secondary to long-term use of nitrofurantoin: high-resolution computed tomography findings. J Bras Pneumol 2008; 34: 181—184.
- Spry C.J.F. Eosinophilia and allergic reactions to drugs. Clinics in Haematology 1980; 9: 521—534.
- Lopez M., Salvaggio J.E. Eosinophilic pneumonias. Immunol Allergy Clin North Am 1992; 12: 349—363.
- Drugs that may injure the respiratory system. Pneumotox On Line. <http://www.pneumotox.com/index.php?fich=drugs&en=fr>.
- Martin W.J. II. Nitrofurantoin: potential direct and indirect mechanisms of lung injury. Chest. 1983; 83: Suppl 5: S1S—S2S.
- Ho D., Tashkin D.P., Bein M.F., Sharma O. Pulmonary infiltrates with eosinophilia associated with tetracycline. Chest 1979; 76: 33—36.
- Robles D.T., Leonard J.L., Compton N. et al. Severe drug hypersensitivity reaction in a young woman treated with doxycycline. Dermatology 2008; 217 (1): 23—26.
- Stibon O., Bidel N., Dussot C., Azarian R., Braud M.L., Lebarry F. et al. Minocycline pneumonitis and eosinophilia. Arch Intern Med 1994; 154: 1633—1640.
- Dykhuizen R.S., Zaidi A.M., Godden D.J., Jegarajah S., Legge J.S. Minocycline and pulmonary eosinophilia. BMJ 1995; 310: 1520—1521.
- Liegeon M.N., De Blay F., Jaeger A., Pauli G. A cause of respiratory distress: eosinophilic pneumopathy due to minocycline. Rev Mal Respir 1996; 13 (5): 517—519.
- Ono E., Miyazaki E., Matsuno O. et al. Minocycline-induced acute eosinophilic pneumonia: controversial results of lymphocyte stimulation test and re-challenge test. Intern Med 2007; 46 (9): 593—595.
- Shimizu T., Shimizu N., Kinebuchi S. et al. Case of acute eosinophilic pneumonia probably induced by minocycline. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 2008; 46 (2): 136—140.
- Rosen E. Eosinophilic pneumonia induced by minocycline. Harefuah 2000; 139 (11—12): 438—440, 494.
- Hung S.W. Minocycline-induced acute eosinophilic pneumonia: A case report and review of the literature. Respir Med Case Rep 2015; 30: 15: 110—114.
- Kondo H., Fujita J., Inoue T. et al. Minocycline-induced pneumonitis presenting as multiple ring-shaped opacities on chest CT, pathologically diagnosed bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP). Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 2001; 39 (3): 215—219.
- Bando T., Fujimura M., Noda Y. et al. Minocycline-induced pneumonitis with bilateral hilar lymphadenopathy and pleural effusion. Intern Med 1994; 33 (3): 177—179.
- Bentur L., Bar-Kana Y., Livni E. et al. Severe minocycline-induced eosinophilic pneumonia: extrapulmonary manifestations and the use of in vitro immunoassays. Ann Pharmacother 1997; 31 (6): 733—735.
- Hidalgo C.F.J., de Andrés M.S., Ramallal Jiménez de Llano M. et al. Minocycline-induced pleurocarditis and eosinophilic pneumonia: è propos of a case. Farm Hosp 2005; 29 (2): 145—147.
- Osana S., Fukuzawa J., Akiba Y. et al. Minocycline-induced pneumonia and pleurisy — a case report. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi 1992; 30 (2): 322—327.
- Nakano K., Gemma H., Ono T. et al. A case of minocycline-induced eosinophilic pneumonia presenting with multiple white eosinophilic plaques in the tracheobronchial mucosa. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 2001; 39 (1): 24—29.
- Dreis D.F., Winterbauer R.H., Van Norman G.A. et al. Cephalosporin-induced interstitial pneumonitis. Chest. 1984 Jul; 86 (1): 138—140.
- Smith J.H., Weinstein V.F. Cephalixin associated pulmonary infiltration with circulating eosinophilia. BMJ 1987; 294: 776.
- Felman R.H., Sutherland D.B., Conklin J.L., Mitros F.A. Eosinophilic cholecystitis, appendiceal inflammation, pericarditis, and cephalosporin-associated eosinophilia. Dig Dis Sci 1994; 39: 418—422.
- Akcam F.Z., Aygun F.O., Akkaya V.B. DRESS like severe drug rash with eosinophilia, atypical lymphocytosis and fever secondary to ceftriaxone. J Infect 2006; 53 (2): e51—53.
- Desai K.R., Burdette S.D., Polenakovik H.M., et al. Ceftaroline-induced eosinophilic pneumonia. Pharmacotherapy 2013; 33 (7): e166—169.
- Griffiths C.L., Gutierrez K.C., Pitt R.D., Lovell R.D. Eosinophilic pneumonia induced by ceftaroline. Am J Health Syst Pharm 2014; 71 (5): 403—406.
- Polenakovik H.M., Pleiman C.M. Ceftaroline for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: case series and review of the literature. Int J Antimicrob Agents 2013; 42 (5): 450—455.
- Suzuki K., Inagaki T., Adachi S., Matsuura T., Yamamoto T. A case of cef-tazidime-induced pneumonitis. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi 1993; 31: 512—516.
- Suzuki K., Yamamoto K., Kishimoto A., Hayakawa T., Yamamoto T. A case of ceftizoxime-induced pneumonitis. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi 1985; 23: 1357—1361.

49. Patel A.M., Ryu J.H., Reed C.E. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 661—670.
50. Selman M., Pardo A., King T.E. Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186 (4): 314—324.
51. Sánchez-Sancho F., Perez-Inestrosa E., Suau R., Montañez M.I., Mayorga C., Torres M.J., et al. Synthesis, characterization and immunochemical evaluation of cephalosporin antigenic determinants. *J Mol Recognit* 2003; 16 (3): 148—156.
52. Lee S.H., Kim M., Lee K. et al. Hypersensitivity pneumonitis caused by cephalosporins with identical R1 side chains. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015; 7 (5): 518—522.
53. Suzuki K., Inagaki T., Adachi S. et al. A case of ceftazidime-induced pneumonitis. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1993; 31 (4): 512—516.
54. Campi P., Pichler W.J. Quinolone hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3 (4): 275—281.
55. Jammalamadaka D., Zhang H., Sandur S. Pulmonary Toxicity with Fluoroquinolones. *The Internet Journal of Pulmonary Medicine* 2008; 11 (2): 10—12.
56. Steiger D., Bubendorf L., Oberholzer M. et al. Ciprofloxacin-induced acute interstitial pneumonitis. *Eur Respir J* 2004; 23 (1): 172—174.
57. Pérez-Castrillón J.L., Jiménez-García R., Martín-Escudero J.C., Velasco C. Roxithromycin-induced eosinophilic pneumonia. *Ann Pharmacother* 2002; 36 (11): 1808—1809.
58. Hayes D. Jr., Anstead M.I., Kuhn R.J. Eosinophilic pneumonia induced by daptomycin. *J Infect* 2007; 54 (4): e211—213.
59. Cobb E., Kimbrough R.C., Nugent K.M., Phy M.P. Organizing pneumonia and pulmonary eosinophilic infiltration associated with daptomycin. *Ann. Pharmacother* 2007; 41 (4): 696—701.
60. Miller B.A., Gray A., Leblanc T.W. et al. Acute eosinophilic pneumonia secondary to daptomycin: a report of three cases. *Clin Infect Dis* 2010; 50 (11): e63—68.
61. Kalogeropoulos A., Tsiodras S., Loverdos D. et al. Eosinophilic pneumonia associated with daptomycin: a case report and a review of the literature. *J Med Case Rep* 2011; 5: 13.
62. Rether C., Conen A., Grossenbacher M., Albrich W.C. A rare cause of pulmonary infiltrates one should be aware of: a case of daptomycin-induced acute eosinophilic pneumonia. *Infection* 2011; 39 (6): 583—585.
63. Kim P.W., Sorbello A.F., Wassel R.T. et al. Eosinophilic pneumonia in patients treated with daptomycin: review of the literature and US FDA adverse event reporting system reports. *Drug Saf* 2012; 35 (6): 447—457.
64. Rajagopal A., Mintz E., Reese L. Daptomycin-induced eosinophilic pneumonia without peripheral eosinophilia. *Chest* 2014; 146: 164A.
65. Phillips J., Cardile A.P., Patterson T.F., Lewis J.S. 2nd. Daptomycin-induced acute eosinophilic pneumonia: analysis of the current data and illustrative case reports. *Scand J Infect Dis* 2013; 45 (10): 804—808.
66. Lal Y., Assimacopoulos A.P. Two cases of daptomycin-induced eosinophilic pneumonia and chronic pneumonitis. *Clin Infect Dis*. 2010; 50 (5): 737—740.
67. Azuma A., Kudoh S. High prevalence of drug-induced pneumonia in Japan. *JMAJ* 2007; 50 (5): 405—411.
68. Milosavljevic T., Ivkovic A., Radovanovic Z. Interstitial lung disease induced by antibiotics. MDCT with perfusion, MRI with DWI and MDCT guided lung biopsy. *European Respiratory Journal* Sep 2013; 42: Suppl 57: 3026.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Дворецкий Леонид Иванович — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии №2 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва

Суворова Маргарита Петровна — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии №2 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва

Яковлев Сергей Владимирович — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии №2 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва



Короткий курс терапии ОИКМТ^{*,#}, 1-3

Сивекстро предлагает короткий 6-дневный курс лечения осложненных инфекций кожи и мягких тканей (ОИКМТ)^{*,#}, в том числе вызванных MRSA, 1 раз в день с возможностью прямого перехода с внутривенной формы на пероральную¹

ОДИН РАЗ В ДЕНЬ
СИВЕКСТРО
(тедизолид фосфат) 200 мг
Для терапии инфекций кожи

^{*}В исследования III фазы были включены пациенты с острыми бактериальными инфекциями кожи и мягких тканей (ОБИКМТ) – вид осложненной инфекции кожи и мягких тканей, который включает целлюлит/рожистое воспаление, обширный абсцесс кожи и раневую инфекцию, и определяется как бактериальная инфекция кожи с площадью очага поражения ≥ 75 см² (размер очага измеряется по площади эритемы, отека или уплотнения)⁴; MRSA – метициллин-резистентный *S. aureus*.

[#]Среди зарегистрированных в РФ препаратов с активностью против MRSA для лечения ОИКМТ из групп гликопептидов, оксазолидинонов, липопептидов и липогликопептидов.

СИВЕКСТРО / SIVEXTRO. Международное непатентованное наименование: Тедизолид / Tedizolid. **Лекарственная форма:** 1) Лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий. Один флакон содержит тедизолида фосфат 200 мг (210 мг с учетом избытка наполнения); 2) Таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Одна таблетка, покрытая оболочкой, содержит: тедизолида фосфат 200 мг. **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:** Осложненные инфекции кожи и мягких тканей, вызванные чувствительными микроорганизмами: *Staphylococcus aureus* (включая метициллин-резистентный [MRSA] и метициллин-чувствительный [MSSA] штаммы); *Streptococcus pyogenes* (группа А бета-гемолитические стрептококки); *Streptococcus agalactiae* (группа В бета-гемолитические стрептококки); группа *Streptococcus anginosus*, включая *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* и *Streptococcus constellatus*; *Enterococcus faecalis*. Необходимо принимать во внимание действующие официальные руководства о правилах применения антибактериальных средств. **ПРОТИВПОКАЗАНИЯ.** Возраст до 18 лет (безопасность и эффективность у данной возрастной группы не установлены). Повышенная чувствительность к тедизолиду или вспомогательным веществам препарата. **С ОСТОРОЖНОСТЬЮ:** Повышенная чувствительность к другим оксазолидинонам в анамнезе. **СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ:** 1) Препарат в форме лиофилизата для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий предназначен для внутривенного инфузионного введения. Рекомендуемый режим дозирования у пациентов в возрасте 18 лет и старше: при осложненных инфекциях кожи и мягких тканей 200 мг 1 раз в сутки в течение 6 дней, продолжительность инфузии – 60 мин; 2) При переходе с внутривенного на пероральное применение препарата Сивекстро коррекции дозы не требуется. Для таблеток, покрытых пленочной оболочкой, рекомендуемый режим дозирования у пациентов в возрасте 18 лет и старше: при осложненных инфекциях кожи и мягких тканей 200 мг (1 таблетка, п. пл/об) 1 раз в сутки в течение 6 дней. Может приниматься независимо от приема пищи. Если пациент пропустил прием препарата, пропущенную таблетку следует принять как можно скорее, но не позднее 8 часов до следующего планового приема. Если до следующего приема осталось менее 8 часов, пропущенную таблетку принимать не следует. Подробная информация содержится в полной версии инструкции по применению препарата для медицинского применения. **ПОБОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ.** Наиболее частыми нежелательными реакциями, развившимися у пациентов, получавших препарат Сивекстро, были тошнота, головная боль, диарея, рвота. Также часто отмечались головокружение, генерализованный зуд и общее недомогание. **ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:** Байер Фарма АГ, Германия. **Регистрационный номер:** 1) Лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий – ЛП-003660. Актуальная версия инструкции от 02.11.2016. 2) Таблетки, покрытые пленочной оболочкой – ЛП-003761. Актуальная версия инструкции от 24.01.2017. Отпускается по рецепту врача. Подробная информация содержится в инструкции по применению.

Литература: 1. Актуальная инструкция по медицинскому применению препарата Сивекстро ЛП-003660 от 02.11.2016 (для внутривенного инфузионного введения) и ЛП-003761 от 24.01.2017 (для перорального приема). 2. Prokocimer P, et al. JAMA. 2013; 309: 559–69. 3. Moran G.J. et al. Lancet Infect Dis. 2014; 14(8): 696–705. 4. US Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Acute bacterial skin and skin structure infections: developing drugs for treatment. October 2013. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071185.pdf>. Accessed March 13, 2015.

АО «БАЙЕР», 107113, Москва, 3-я Рыбинская ул., д. 18, стр. 2. Тел.: +7 (495) 231 1200, факс: +7 (495) 231 1202. www.pharma.bayer.ru