

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 62



9-10'2017

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

9—10'2017

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. Климов Н. Н.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Клясова Г. А.
Бибилова 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.	Тең 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

- Рогожин Е. А., Кисиль О. В., Черетаев И. В., Завриев С. К.
Характеристика белково-пептидного экстракта
семян мари белой (*Chenopodium album* L.):
изучение компонентного состава,
антимикробных и аналгетических свойств
Фельдман Н. Б., Гудкова О. И.,
Курьяков В. Н., Громоных Т. И., Баранова А. А.,
Садыкова В. С., Луценко С. В.
Биологическая активность липосомного силибинина
Коленчукова О. А., Сарматова Н. И., Мошев А. В.
Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов
в ответ на воздействие β -лактамаз расширенного спектра
(*Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*;
Pseudomonas aeruginosa)

В помощь практикующему врачу

- Каменева О. А., Морозова С. Е., Пунченко О. Е.,
Косякова К. Г., Сидоренко С. В.
Этиологическая структура и антибиотикорезистентность
возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих
путей в Санкт-Петербурге, 2013—2015 гг.
Хохлова О. Е., Перьянова О. В., Владимиров И. В.,
Мацкевич В. А., Поткина Н. К., Капшук Д. Н.,
Копытко Л. Н., Гостев В. В., Сидоренко С. В.,
Ивао Я., Ямамото Т.
Микробиологический мониторинг гнойных осложнений
у ожоговых больных и молекулярно-генетические
особенности метициллинрезистентных
Staphylococcus aureus (MRSA)
Журавлева М. В., Яровой С. К., Прокофьев А. Б.,
Бердникова Н. Г., Пономаренко Т. М.,
Родионов Б. А., Каменева Т. Р., Лазарева Н. Б.,
Сереброва С. Ю., Сухобрус И. В.
Актуальные вопросы эмпирической антимикробной
терапии инфекции мочевыводящих путей
со стратификацией пациентов
по риску антибиотикорезистентности

Стандартизация и контроль лекарственных средств

- Кузьмина Н. Е., Моисеев С. В., Крылов В. И.,
Яшкир В. А., Меркулов В. А.
Разработка методики подтверждения подлинности
фармацевтической субстанции «бусерелина ацетат»
методом ЯМР спектроскопии без использования
фармакопейного стандартного образца

Обзоры

- Самусева А. А., Любота Р. В., Зотов А. С., Верещако Р. И.
Клиническое значение экспрессии топоизомеразы 2 α
при раке молочной железы

Original Papers

- 3 Rogozhin E. A., Kisil O. V., Cheretaev I. V., Zavriev S. K.
Characterization of Protein and Peptide Extract
from Lamb's Quarters' (*Chenopodium Album* L.) Seeds:
Studying of Composition, Antimicrobial
and Analgesic Properties
9 Feldman N. B., Gudkova O. I., Kuryakov V. N.,
Gromovych T. I., Baranova A. A.,
Sadykova V. S., Lutsenko S. V.
Biological Activity of Liposomal Silibinin
15 Kolenchukova O. A., Sarmatova N. I., Moshev A. V.
Phagocytic Activity of Neutrophilic Granulocytes
in Response to the Effect of Extended-Spectrum β -Lactamases
(*Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*;
Pseudomonas aeruginosa)

Guidelines for Practitioners

- 19 Kameneva O. A., Morozova S. E., Punchenko O. E.,
Kosyakova K. G., Sidorenko S. V.
The Etiological Structure and Antibiotic Resistance
of Pathogens of Community-Acquired Infections of the Urinary
Tract in St. Petersburg, 2013—2015
27 Khokhlova O. E., Peryanova O. V., Vladimirov I. V.,
Matskevich V. A., Potkina N. K., Kapshuk D. N.,
Kopytko L. N., Gostev V. V., Sidorenko S. V.,
Iwao Ya., Yamamoto T.
Microbiological Monitoring of Purulent
Complications in Burn Patients and Molecular
Genetic Features of Methicillin-Resistant
Staphylococcus aureus (MRSA)
34 Zhuravleva M. V., Yarovoy S. K., Prokofiev A. B.,
Berdnikova N. G., Ponomarenko T. M.,
Rodionov B. A., Kameneva T. R., Lazareva N. B.,
Serebrova S. Yu., Sukhobrus I. V.
Contemporary Approach to Antibiotic Therapy
of Urinary Tract Infection

Drug Standardization and Control

- 40 Kuzmina N. E., Moiseev S. V., Krylov V. I.,
Yashkir V. A., Merkulov V. A.
Development of a Procedure for the Identification
of Pharmaceutical Substance
«Buserelin Acetate» by NMR Spectroscopy without
Using Pharmacopoeia Reference Standard

Reviews

- 47 Samuseva A. A., Lyubota R. V., Zotov A. S., Vereshchako R. I.
Clinical Significance of Expression
of Topoisomerase 2 α in Breast Cancer

* 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.

Характеристика белково-пептидного экстракта семян мари белой (*Chenopodium album* L.): изучение компонентного состава, антимикробных и анальгетических свойств

*Е. А. РОГОЖИН^{1,2}, О. В. КИСИЛЬ², И. В. ЧЕРЕТАЕВ³, С. К. ЗАВРИЕВ¹

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

² НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

³ Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь

Characterization of Protein and Peptide Extract from Lamb's Quarters' (*Chenopodium album* L.) Seeds: Studying of Composition, Antimicrobial and Analgesic Properties

*E. A. ROGOZHIN^{1,2}, O. V. KISIL², I. V. CHERETAEV³, S. K. ZAVRIEV¹

¹ M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

² G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

³ V. I. Vernadsky Crimea State University, Simferopol

В рамках настоящего исследования был проведён первичный структурный анализ и изучены биологические свойства белково-пептидного экстракта, полученного из семян мари белой (*Chenopodium album* L.). Было показано, что полученный обогащённый концентрат обладал выраженными фунгицидными свойствами по отношению к ряду фитопатогенных (*Fusarium oxysporum*, *Thielaviopsis basicola*) и условно-патогенных грибов (*Aspergillus* spp.) на количественном уровне, сопоставимом с действием коммерческих противогрибных препаратов, при этом обладал умеренными антибактериальными свойствами (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), не связанными с рибосоминактивирующей активностью. При изучении анальгетической активности данного экстракта в моделях острой боли «горячая вода», «горячая пластина» и «электростимуляция» продемонстрировано её наличие в широком диапазоне действующих концентраций, при этом их эффект проявляется как на спинальном, так и на супраспинальном уровнях регуляции болевой чувствительности. Первичная структурная характеристика суммарных фракций активного экстракта, по данным масс-спектрометрического анализа, позволила выявить набор компонентов в широком диапазоне молекулярных масс (1,9—12,5 кДа), белковая природа некоторых из них была подтверждена спектрофотометрически и N-концевым автоматическим секвенированием по методу Эдмана. Совокупность полученных данных позволяет позиционировать семена мари белой как богатый источник биологически активных полипептидов с антибиотическими и терапевтическими свойствами.

Ключевые слова: мари белая, *Chenopodium album*, семена, белки и пептиды, антимикробная активность, анальгетические свойства, жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, секвенирование по Эдману.

In this work a primary structural analysis has been carried out and biological properties of protein-peptide extract from lamb's quarters (*Chenopodium album* L.) were studied. It has been shown that the obtained enriched concentrate displayed potent fungicidal properties towards a number of phytopathogenic (*Fusarium oxysporum*, *Thielaviopsis basicola*) and opportunistic fungi (*Aspergillus* spp.) at a quantitative level comparable with the effect of commercial antifungal drugs, at the same time possessing moderate antibacterial properties (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) not associated with ribosome-inactivating activity. When studying the analgesic activity of this extract in acute pain models («hot water», «hot plate», and «electro stimulation»), it demonstrated activity in a wide range of active concentrations and at the same time their effect was manifested both at the spinal and supraspinal levels of pain sensitivity. The primary structural characteristic of the total fractions of the active extract based on mass spectrometry analysis revealed a set of compounds in a wide range of molecular masses (1.9—12.5 kDa), and protein chemical base of some of them has been confirmed by a combination of spectrophotometric analysis and N-terminal Edman sequencing. The totality of the data obtained allows positioning of the lamb's quarters' seeds as a rich source of biologically active polypeptides with antibiotic and analgesic properties.

Keywords: lamb's quarters, *Chenopodium album*, seeds, proteins and peptides, antimicrobial activity, analgesic properties, liquid chromatography, mass spectrometry, Edman sequencing.

Введение

Существует растущий интерес общественности к фитотерапии, особенно при лечении боль-

шого спектра хронических, а также инфекционных заболеваний отчасти из-за ограниченного выбора в фармакотерапии. Данные *in vitro*, *in vivo*, доклинические и клинические испытания показывают, что компоненты растительных экстрактов могут быть полезны как альтернативный или дополнительный метод терапии. Растения издав-

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: E-mail: rea21@list.tu

на используются в качестве источника биологически активных соединений. Одним из таких растений является марь белая (*Chenopodium album* L.) — монокарпическое однолетнее стержнекорневое растение семейства маревых (*Chenopodiaceae*), которое обладает антимикробным, противовоспалительным и успокоительным действием и широко распространена на территории России, от полярного круга до высокогорий в южных районах и является сорным видом во всех областях средней России [1]. Марь белая является лекарственным растением и используется в народной медицине и является источником экстрактов с антиоксидантным, антимикробным, противовоспалительным и успокоительным действием [2]. Информация о том, что различные виды *Chenopodium* обладают целебными свойствами, встречается в таких древних текстах, как Аюрведа, *Atharva Veda*, *Charak Samhita*, *Sushruta Samhita* etc. [3]. Для органических экстрактов из различных органов данного растения (листьев, стеблей, семян, вегетативная масса полностью) разными авторами показан спектр разнообразных активностей, таких как гепатопротекторное действие в сравнении с силимарином против гепатотоксичности, вызванной тетрахлорметаном совместно с парацетамолом (этанольный экстракт) [4], спазмолитический и анальгетический эффекты *in vitro* на гладкой мускулатуре кролика и *in vivo* на лабораторных мышах (бутанольный экстракт) [4], фунгицидное и бактерицидное действие по отношению к спектру патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов (метанольный, этанольный и гексановый экстракты) [5, 6], а также целый ряд других. Однако, несмотря на вышесказанное, характеристика компонентов водных экстрактов мари белой как в структурном, так и в функциональном аспектах, практически не была затронута, что открывает широкие возможности для выявления новых и потенциально эффективных биологически активных эффекторных молекул, в том числе полипептидной природы.

Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в изучении антифунгальных и анальгетических свойств кислотно-водного экстракта семян мари белой (*C. album*), а также проведении его первичной структурной характеристики.

Материал и методы

Биологический материал. Семена мари белой (*C. album* L.) были собраны в г. Пушкино Московской области в 2008 году и хранились в сухом проветриваемом помещении при средней температуре 15°C.

Микроорганизмы. Культуры фитопатогенных грибов: *Fusarium oxysporum* штамм ТСХА-4 (из коллекции сектора фитопатологии кафедры защиты растений РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева), *Thielaviopsis basicola* штамм VKM F-972 (Всероссийская коллекция микроорганизмов ИБФМ им. Г. К. Скрыбина РАН). Условно-патогенные грибы *Aspergillus niger* штамм INA 007606, *A.oryzae* 1K, *A.niger* 2K, *A.fumigatus* 4K, *A.terreus* 4K, *A.fischeri* 3K,

A.flavus 7K были получены из коллекции НИИНА им. Г. Ф. Гаузе). Культуры бактерий *Escherichia coli* штамм ATCC 25922 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (из коллекции НИИНА им. Г. Ф. Гаузе).

Кислотная экстракция и фракционирование. Получение обогащённого белково-пептидного экстракта семян мари белой проводили в точном соответствии с методикой, описанной в работе [7]. Дальнейшее разделение полученного обессоленного концентрата проводили методом препаративной гель-проникающей хроматографии среднего давления на колонке Sephacryl S100HR (20×495 мм), согласно протоколу, изложенному в работе [8]. Детектирование поглощения осуществляли при длине волны 280 нм.

Масс-спектрометрия. Масс-спектры регистрировались с использованием прибора Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы была использована 2,5-дигидроксibenзойная кислота (DHB) (Sigma, США).

Измерение спектров УФ-поглощения. Для получения спектров поглощения лиофильно высушенную суммарную фракцию растворяли в 1 мл воды MQ (Millipore, США). Спектры поглощения снимали на спектрофотометре U-3210 (Jasco, Япония). Длина оптического пути составляла 1 см. В качестве контроля использовали воду MQ.

N-концевое секвенирование по Эдману суммарных фракций проводили на приборе PPSQ-33A (Shimadzu Corp., Япония) в точном соответствии с протоколом фирмы-производителя. Идентификацию ФТГ-производных аминокислот осуществляли с помощью программного обеспечения LabSolution версия 1.1 (Shimadzu Corp., Япония).

Анализ антимикробной активности проводили согласно методу, описанному в работе [9].

Исследование анальгетической активности. Исследования выполнены на 40 белых беспородных крысах-самцах (250—270 г, разделены на 4 группы по 10 особей) в моделях острой боли «горячая вода» (53°C), «горячая пластина» (45°C) и «электростимуляция». Контрольной группе вводили внутривенно 0,2 мл 0,9% NaCl, а опытным — тотальный обессоленный экстракт семян мари белой в дозах 8,5, 85 и 850 мкг/кг в том же объёме. Разведение осуществляли 0,9% NaCl.

Рибосоминактивирующие свойства экстракта мари белой устанавливали методом ингибирования трансляции на модельном штамме *E.coli*, трансформированном репортерным плазмидным вектором pRFP-CER-TrpL2A [10,11].

Статистическую обработку проводили критерием Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Изучение антимикробной активности тотального экстракта семян мари белой *in vitro*. Из покоящихся семян мари белой по разработанному и многократно апробированному ранее протоколу [7, 12, 13] методом кислотной экстракции с последующим высаждением органическим растворителем (ацетоном) и обессоливанием методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) был получен тотальный экстракт, обогащённый белково-пептидными компонентами. В дальнейшем данный экстракт был протестирован на наличие антимикробной (антибиотической) активности *in vitro* диско-диффузионным методом, а также анальгетических свойств *in vivo* с применением трёх базовых моделей острой боли («горячая вода», «горячая пластина» и «электростимуляция»).

При исследовании экстракта ингибирующей активности по отношению к спектру мицелли-

альных грибов была показана выраженная тотальная фунгицидная активность для фитопатогенов при действующей концентрации 100 мкг/мл (так, для культур *F.oxysporum* и *T.basicola* диаметр зон подавления роста составил 25 и 28 мм, соответственно), что касается тест-объектов — видов рода *Aspergillus* (*A.niger*, *A.oryzae*, *A.fumigatus*, *A.terreus*, *A.fisheri* и *A.flavus*), то среди них наибольшую степень восприимчивости к действию компонентов исследуемого экстракта продемонстрировали *A.niger* и *A.oryzae* (15 и 17 мм, соответственно), в то время как биологический эффект на остальные тестируемые микроорганизмы был минимальный (в среднем 10–11 мм), что в целом соответствовало уровню подавляющего действия положительного контроля — коммерческого антигрибного антибиотика амфотерицина Б (при концентрации 40 мкг/мл). Интересно, что биологическая активность белково-пептидного экстракта семян мари белой оказалась более выражена именно по отношению к грибам-микромикотам — специфическим фитопатогенам, тогда как на условно-патогенные микроорганизмы ингибирующий эффект был детектирован на гораздо менее выраженном количественном уровне, даже несмотря на то, что некоторые виды рода *Aspergillus* (*A.niger*, *A.oryzae*) часто входят в состав комплексной грибной инфекции, вызывающей плесневение семян злаков в поле. Так, в серии предыдущих работ были проведены комплексные лабораторные исследования и исследования пептидных экстрактов некоторых лекарственных растений, используемых в традиционной медицине для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, на проявление как прямого антимикробного действия на прорастание конидий и рост колоний фитопатогенных грибов и оомицетов [14], так и опосредованно, за счёт ингибирования системы так называемого «чувства кворума» («quorum sensing») патогенных грамотрицательных бактерий [15, 16].

С целью выявления полученных ранее коллективом авторов [6, 17] данных о наличии у экстрактов из различных органов мари белой антибактериальных свойств, а также способности к ауторегуляции путём ингибирования процесса трансляции собственных мРНК, было проведено тестирование изучаемого экстракта на рибосоминактивирующую активность в прокариотической системе (*E.coli*) на основе трансформированного репортёрного плазмидного вектора pRFPCER-TrpL2A [10], который был успешно использован как для скрининга новых антибиотиков — ингибиторов трансляции, так и для первичной идентификации молекулярной мишени для многообразия уже охарактеризованных в функциональном плане молекул — амикумацина А [11], авиламицина, эвернимицина [18] и клеб-

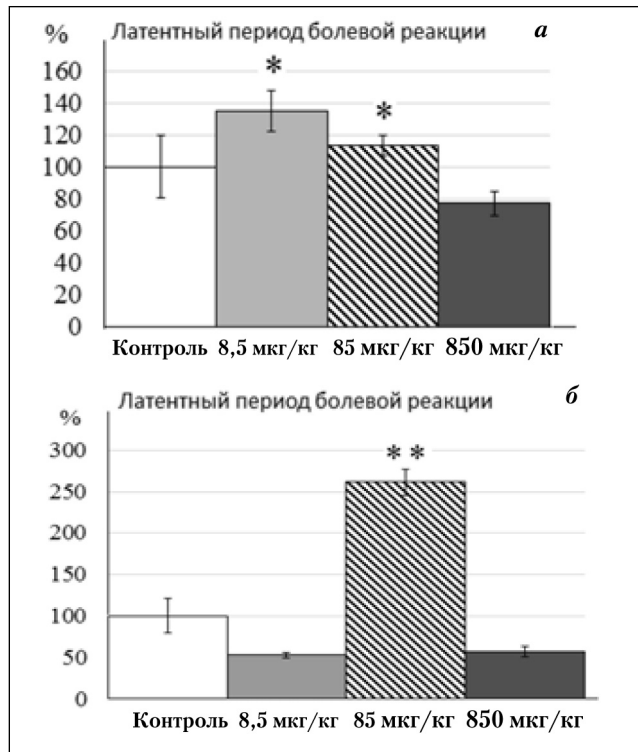


Рис. 1. Эффекты различных доз тотального белково-пептидного экстракта семян мари белой на болевую чувствительность крыс.

а — в тесте «горячая вода»; б — тесте «горячая пластина».

сазолицина [19]. Однако при действующей концентрации 500 мкг/мл обогащённый белково-пептидный концентрат семян мари не проявил детектируемых рибосоминактивирующих свойств, несмотря на ингибирование роста колоний как грамположительного (*B.subtilis*), так и грамотрицательного (*E.coli*) модельных штаммов.

Исследование анальгетических свойств тотального экстракта семян мари в моделях острой боли. Другим направлением настоящего исследования послужило выявление у изучаемого экстракта семян мари возможных анальгетических свойств, основой которому послужили литературные данные об активности спиртового экстракта листьев близкородственного *C.album* вида — мари амброзиевидной (*C.ambrosioides*) [20]. Настоящие исследования были выполнены на 40 белых беспородных крысах-самцах на моделях острой боли «горячая вода» (53°C), «горячая пластина» (45°C) и «электростимуляция» в трёх концентрациях, полученных посредством 10-кратного разведения (8,5; 85 и 850 мкг/кг в 0,9% растворе NaCl). В результате по тесту «горячая вода» исследуемый обессоленный тотальный экстракт мари белой увеличивал ($p \leq 0,05$) латентный период болевой реакции крыс в дозах 8,5 и 85 мкг/кг относительно контроля (рис. 1, а). Следовательно, можно заключить, что в этом тесте тотальный экстракт ма-

ри белой обладает анальгетическим эффектом в дозах 8,5 и 85 мкг/кг, достоверно повышая латентный период болевой реакции крыс на термораздражитель. Это свидетельствует об эффективности указанных доз экстракта на спинальном уровне регуляции болевой чувствительности. В тесте «горячая пластина» достоверные изменения латентного периода болевой реакции животных по сравнению с контролем наблюдались только в дозе 85 мкг/кг (рис. 1, б). Таким образом, в тесте «горячая пластина» тотальный экстракт мари белой проявляет анальгетическую активность в дозе 85 мкг/кг. Это указывает на эффективность тестируемого экстракта в данной дозе на супраспинальном уровне регуляции болевой чувствительности.

В тесте «электростимуляция» исследуемый экстракт достоверно увеличивал болевой порог животных в дозах 8,5 ($p \leq 0,01$) и 850 ($p \leq 0,05$) мкг/кг относительно контрольной группы (рис. 2). Таким образом, в тесте «электростимуляция» тотальный экстракт мари белой проявляет анальгетическую активность в дозах 8,5 и 850 мкг/кг, достоверно снижая болевой порог животных. Изменения в данном тесте свидетельствуют о том, что тестируемый экстракт эффективен как на спинальном, так и на супраспинальном уровне регуляции болевой чувствительности.

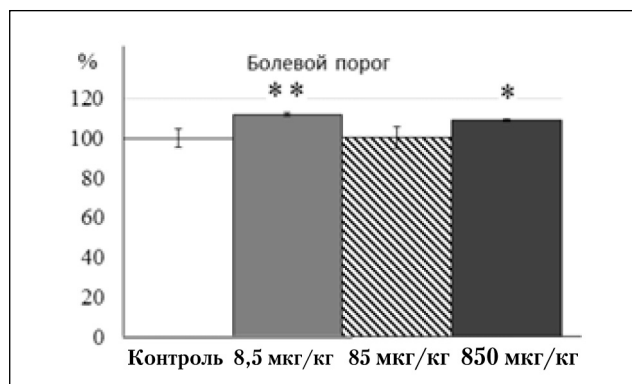


Рис. 2. Эффекты различных доз тотального белково-пептидного экстракта семян мари белой на болевую чувствительность крыс в тесте «электростимуляция».

Фракционирование тотального экстракта семян мари белой и первичная структурная характеристика компонентного состава. Для осуществления фракционирования и проведения первичной структурной характеристики суммарных фракций активного экстракта был использован подход, который ранее был успешно применён при анализе белков и пептидов семян одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) [8]. Принципиальная общая схема анализа приведена на рис. 3. Как было уже отмечено ранее, полученный концентрат был разделён методом препаративной гель-проникающей хроматографии среднего давления, в результате которого было получено 4 основных суммарных объединённых фракции в зависимости по времени их удерживания на колонке (названных «Б», «П», «ОС» и «ПГ»), что имело прямую корреляцию с уменьшением их молекулярной массы и/или размера (рис. 4).

Каждая из собранных фракций была сконцентрирована и протестирована на наличие антифунгальной активности исключительно в отношении спектра наиболее восприимчивых к действию тотального экстракта модельных культур мицелиальных грибов (*F.oxysporum*, *T.basicola*, *A.niger* и *A.oryzae*). В результате на-

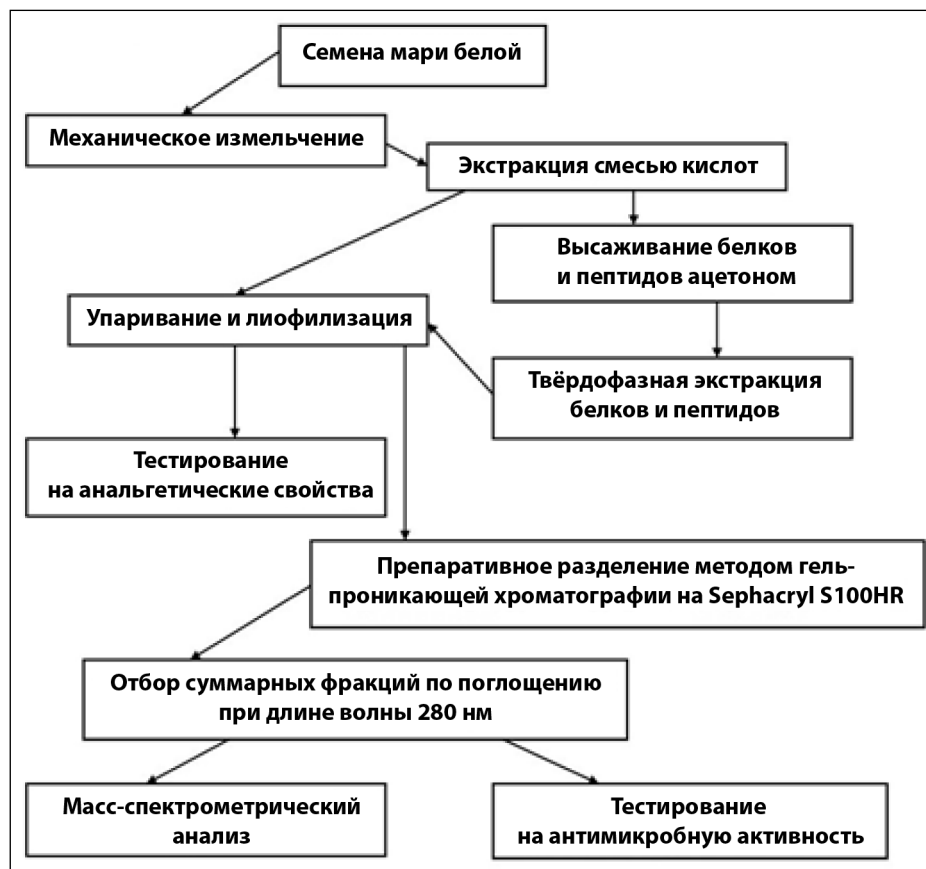


Рис. 3. Принципиальная схема структурно-функционального анализа компонентов семян мари белой (*C.album*).

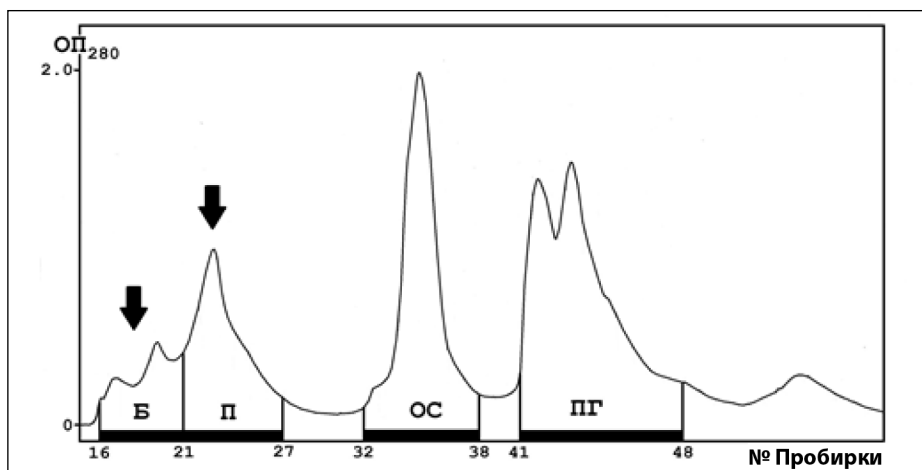


Рис. 4. Профиль хроматографического разделения суммарного кислотного экстракта семян мари после высаживания ацетоном. Обозначены зоны элюирования суммарных фракций: «Б» — белковая; «П» — пептидная; «ОС» — органические соли; «ПГ» — пигменты.

личие рост-ингибирующей активности показали все 4 тестируемых фракции, однако наиболее выраженный эффект был отмечен у вариантов «Б» и «П» (значения диаметров зон ингибирования были отмечены в диапазоне 18–32 мм, что выше таковых по тотальному концентрату). С целью выявления потенциального разнообразия компонентного состава данных фракций был проведён их анализ методом MALDI времяпролётной масс-спектрометрии в режиме положительных ионов. Результат позволил идентифицировать набор масс-зарядов в широком диапазоне молекулярных масс (1,9–12,5 кДа) (таблица), при этом их наибольшее количество было детектировано в варианте «П» (пептидной фракции), а также в «Б» (белковой фракции). Белково-пептидная природа была подтверждена только для первых двух фракций «Б» (время выхода с колонки 16–21 пробирка, согласно рис. 4) и «П» (21–27 пробирка), соответственно, спектофотометрическим методом посредством измерения поглощения в УФ (210–340 нм) и видимом (340–800 нм) диапазонах. Так, для первых двух фракций были отмечены два характерных максимума экстинкции при 275–282 нм, а также 210–220 нм, минимум при 250–265 нм, в то время как для 3-й фракции («ОС» со временем элюирования 32–38 пробирка) наблюдался высо-

кий уровень поглощения при 250–260 нм на фоне низкого значения в коротковолновой области УФ-диапазона, что предполагает наличие в ней преимущественно низкомолекулярных органических солей. Что касается суммарной фракции «ПГ» (время удерживания на колонке 41–48 пробирка), то она характеризовалась наличием характерного светлороманового окрашивания, что выражалось также в присутствии дополнительного максимума в диапазоне длин волн видимого света (540–570 нм). Анализируя вышеописан-

ное и принимая во внимание достаточно высокое значение m/z для данной фракции (около 3,4 кДа) можно предположить, что её основу составляют водорастворимые пигменты. Для дополнительного подтверждения локализации полипептидов каждая из фракций после гель-фильтрации была проанализирована методом автоматической ступенчатой деградации по Эдману, и только в первых двух из них (наиболее высокомолекулярных) было идентифицировано наличие фенилтиогидантоин(ФТГ)-производных N-концевых аминокислот (при этом наибольшее поглощение было преимущественно показано для гидрофобных остатков — валина, фенилаланина, лизина и лейцина).

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет позиционировать семена мари белой как богатый источник биологически активных полипептидов с антибиотическими и терапевтическими свойствами.

Благодарности

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00131) (раздел «Исследование анальгетических свойств тотального экстракта семян мари в моделях острой боли»), Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 16-34-60217-мол_а_дк (разделы

Масс-спектрометрический анализ суммарных фракций после гель-фильтрации упаренного и лиофилизованного кислотного экстракта семян мари

Название суммарной фракции*	Молекулярная масса (средняя), Да
Б	12580; 9900; 8870; 7863; 6506; 5523; 5493**
П	9904; 9873 ; 9713; 6528; 6506 ; 6319 ; 6302 ; 6262 ; 6154 ; 6017 ; 5799 ; 5719; 5528; 5493 ; 4841 ; 4440 ; 3948 ; 3929; 3717; 3633; 3391; 3365; 3075; 3021; 2728; 2470 ; 2163 ; 1940
ОС	465
ПГ	3455

Примечание. * — Название суммарной фракции в соответствии с обозначением на рис. 4; ** — жирным шрифтом отмечены массы с наибольшей интенсивностью (в отн. ед.).

«Изучение антимикробной активности тотального экстракта семян мари *in vitro*», «Фракционирование тотального экстракта семян мари и первичная структурная характеристика компонентного состава»). Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе» д.б.н. В. С. Садыковой и аспирантке А. А. Барановой за помощь в проведении тестов анти-

фунгальной активности, сотрудникам отдела структуры и функций РНК НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ д.х.н. П. В. Сергееву и к.х.н. И. А. Остерману за анализ рибосоминактивирующей активности экстракта семян мари. Отдельная благодарность студентке факультета «Биомедицина» Бристольского университета (Великобритания) А. Ланкиной за помощь в поиске и анализе литературы по теме исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новиков В.С., Губанов И.А. Атлас-определитель высших растений предназначен для школьников и юных натуралистов. Школьный атлас-определитель высших растений ... М.: Т-во научных изданий КМК 2002; 526. / Novikov V.S., Gubanov I.A. Atlas-opredelitel' vysshikh rastenij prednaznachен dlya shkol'nikov i junykh naturalistov. Shkol'nyj atlas-opredelitel' vysshikh rastenij ... М.: Т-во научных изданий КМК 2002; 526. [in Russian]
2. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Второе изд., исправ. и доп. К. Наукова думка 1973; 592 С. / Grodzinskiy A.M., Grodzinskiy D.M. Kratkij spravochnik po fiziologii rastenij. Vtoroe izd., isprav. i dop. K. Naukova dumka 1973; 592.
3. Pandey S., Gupta R.K. Screening of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of *Chenopodium album* (Bathua). J Pharmacognosy Phytochemistry 2014; 3 (3): 1–9.
4. Amjad L., Alizad Z. Antibacterial Activity of the *Chenopodium album* Leaves and Flowers. Int J Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering 2012; 6 (1): 2012.
5. Yadav N., Vasudeva N., Singh S., Sharma S.K. Medicinal Properties of genus *Chenopodium* Linn. Nat Product Radiance 2007; 6 (2): 131–134.
6. Singh K.P., Dwevedi A.K., Dhakre G. Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. Inter J Appl Biol Pharm Technol 2011; 2 (3): 1–9.
7. Rogozhin E.A., Oshchepkova Y.I., Odintsova T.I., Khadeeva N.V., Veshkurova O.N., Egorov T.A., Grishin E.V., Salikhov S.I. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. Plant Physiol Biochem 2011; 49 (2): 131–137.
8. Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Sklyar I.V., Musolyamov A.K., Kudryavtsev A.M., Pukhalsky V.A., Smirnov A.N., Grishin E.V. and Egorov T.A. Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. Prot Pept Lett 2010; 17: 522–529.
9. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А., Рогожин Е.А., Громовых Т.И., Куварица А.Е., Баранова А.А. Антимикробная активность веществ, продуцируемых штаммом *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептидов. Антибиотики и химиотер. — 2015. — Т. 60. — № 11–12. — С. 3–8. / Sadykova V.S., Kurakov A.V., Korshun V.A., Rogozhin E.A., Gromovyy T.I., Kuvarina A.E., Baranova A.A. Antimikrobnaya aktivnost' veshchestv, produciруемых shtammom *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ-1228: optimizatsiya laboratornogo kultivirovaniya i spektr dejstviya individual'nykh peptidov. Antibiotiki i khimioterap 2015; 60 (11–12): 3–8. [in Russian]
10. Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O., Boykova Y.V., Efremenkova O.V., Svetlov M.S., Kolb V.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56 (4): 1774–1783.
11. Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusochev P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., Konevega A.L., Shaw K.J., Bogdanov A.A., Rodnina M.V., Dontsova O.A., Mankin A.S., Steitz T.A., Sergiev P.V. Amicoumacin inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome. Mol Cell 2014; 56(4): 531–540.
12. Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Baranov Yu.V., Musolyamov A.Kh., Yalpani N., Egorov Ts.A., Grishin E.V. Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. Biochimie 2008; 90: 1667–1673.
13. Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Grishin E.V., Egorov T.A. Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds. Biochimie 2011; 93 (3): 450–456.
14. Рогожин Е.А., Тенкеева И.И., Зайцев Д.В., Демушкин В.П., Смирнов А.Н. Биологическая активность пептидных экстрактов лекарственных растений против фитопатогенных грибов и оомицетов. Доклады РАСХН. — 2011. — № 4. — С. 34–37. / Rogozhin E.A., Tepkeeva I.I., Zajcev D.V., Demushkin V.P., Smirnov A.N. Biologicheskaya aktivnost' peptidnykh ehkstraktov lekarstvennykh rastenij protiv fitopatogennykh gribov i oomicetov. Doklady RASKHN 2011; 4: 34–37. [in Russian]
15. Tolmacheva A.A., Rogozhin E.A., Deryabin D.G. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants. Acta Pharm 2014; 64: 139–152.
16. Deryabin D.G., Tolmacheva A.A. Antibacterial and Anti-Quorum Sensing Molecular Composition Derived from Quercus cortex (Oak bark) Extract. Molecules 2015; 20 (9): 17093–17108.
17. Park J.S., Hwang D.J., Lee S.M., Kim Y.T., Choi S.B., Cho K.J. Ribosome-inactivating activity and cDNA cloning of antiviral protein isoforms of *Chenopodium album*. Molecules and Cells 2004; 17 (1): 73–80.
18. Arenz S., Juetz M.F., Graf M., Nguyen F., Huter P., Polikanov Y.S., Blanchard S.C., Wilson D.N. Structures of the orthosomycin antibiotics avilamycin and evernimicin in complex with the bacterial 70S ribosome. Proc Natl Acad Sci USA 2016; 113(27): 7527–7532.
19. Mentelev M., Osterman I.A., Ghilarov D., Khabibullina N.F., Yakimov A., Shabalina K., Utkina I., Travin D.Y., Komarova E.S., Serebryakova M., Artamonova T., Khodorkovskii M., Konevega A.L., Sergiev P.V., Severinov K., Polikanov Y.S. Klebsazolicin inhibits 70S ribosome by obstructing the peptide exit tunnel. Nat Chem Biol 2017; 13 (10): 1129–1136.
20. Carvalho e Silva M.A.G., Carneiro L.P., Castelo Branco M.F.G., Barros E.M.L., Lemos S.I., de Barros T.L., Marques R.B. Anti-Inflammatory Effect Of Mastruz (*Chenopodium Ambrosioides*) Extract In Respiratory Distress Syndrome. Int J Pharm Sci Invent 2016; 5 (5): 34–39.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рогожин Евгений Александрович — к.х.н., н.с. лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук», Москва

Кисиль Ольга Валерьевна — к.х.н., ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва

Чертаев Игорь Владимирович — к.б.н, с.н.с Таврической академии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь

Завриев Сергей Кирикович — д.б.н., профессор, член-корр. РАН, зав. отделом молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук», Москва

Биологическая активность липосомного силибинина

* Н. Б. ФЕЛЬДМАН¹, О. И. ГУДКОВА¹, В. Н. КУРЬЯКОВ², Т. И. ГРОМОВЫХ¹,
А. А. БАРАНОВА³, В. С. САДЫКОВА³, С. В. ЛУЦЕНКО¹

¹ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

² Институт проблем нефти и газа РАН, Москва

³ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

Biological Activity of Liposomal Silibinin

*N. B. FELDMAN¹, O. I. GUDKOVA¹, V. N. KURYAKOV², T. I. GROMOVYKH¹,
A. A. BARANOVA³, V. S. SADYKOVA³, S. V. LUTSENKO¹

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

² Oil and Gas Research Institute RAS, Moscow

³ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Цель работы — получение и характеристика липосомного силибинина, а также исследование его противоопухолевой и антимикробной активности. Липосомы получали методом гидратации тонкослойной пленки буферным раствором с последующим многократным замораживанием—оттаиванием дисперсии фосфатидилхолин-холестерин-силибинин. Установлено, что липосомный силибинин проявляет ингибирующий эффект в отношении опухолевых клеток печени (линия HepG2) и предстательной железы (линия DU145). Кроме того, липосомный силибинин оказывает выраженное антибактериальное действие в отношении бактерий и фунгистатическое действие в отношении токсигенных микромицетов, что может свидетельствовать о его эффективности как антимикробного средства и фунгистатика для снижения негативного действия микотоксинов плесневых грибов.

Ключевые слова: силибинин, липосомы, противоопухолевая активность, антимикробная активность.

The aim of the study was to obtain and characterize liposomal silibinin, as well as to study its antitumor and antimicrobial activity. Liposomes were obtained by hydration of a thin-layer film with a buffer solution followed by multiple freezing-thawing of the dispersion of phosphatidylcholine-cholesterol-silibinin. It has been established that liposomal silibinin has an inhibitory effect against liver (HepG2 line) and prostate gland (DU145 line) tumor cells. In addition, liposomal silibinin has a pronounced antibacterial effect against bacteria and a fungistatic effect on toxigenic micromycetes, which may indicate its effectiveness as an antimicrobial and fungistatic agent for reducing the negative effect of mycotoxins of mold fungi.

Keywords: silibinin, liposomes, antitumor activity, antimicrobial activity.

Введение

Силибинин представляет собой флаволигнан из расторопши пятнистой, проявляющий выраженную гепатопротекторную активность [1–3]. Силибинин является сильным антиоксидантом, активность которого в несколько раз превосходит активность известного антиоксиданта витамина Е [4]. Поскольку как антиоксидант силибинин улавливает свободные радикалы, препятствуя перекисному окислению липидов и повреждению клеточных макромолекул, органелл и биомембран, гепатопротекторное действие силибинина во многом определяется его антиоксидантными свойствами. Кроме того, силибинин препятствует проникновению токсинов в клетки печени благодаря стабилизирующему действию на плазматическую мембрану.

Печень является важнейшим барьером на пути проникновения опасных ксенобиотиков в организм человека. Попадающие в организм человека с пищей афлатоксины, продуцируемые некоторыми видами микромицетов (плесневых грибов) — аспергиллов (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, и др.), представляют серьезную угрозу для организма человека и, особенно, для клеток печени. Микроскопические грибы — контаминаторы зерновых и орехов, продуцируют, в частности, афлатоксин В1, который чрезвычайно токсичен и обладает сильнейшей гепатотоксичностью и гепатоканцерогенной активностью [5]. Показано, что силибинин ингибирует индуцируемое афлатоксином В1 перекисное окисление липидов печени и почек, защищая, таким образом, эти органы от повреждения [6].

В ряде исследований показано, что силибинин, наряду с антиоксидантной, обладает также

© Коллектив авторов, 2017

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

противоопухолевой, противовоспалительной, антиартритной и антиангиогенной активностью [7]. Противоопухолевое действие силибинина продемонстрировано *in vitro* в отношении различных линий опухолевых клеток человека — эпидермоидной карциномы A431 [8], рака желудка MGC-803 [9], карциномы кишечника HT-29 [10], карциномы молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231 [11, 12]. Во всех случаях силибинин подавлял пролиферацию и вызывал апоптотическую гибель опухолевых клеток.

Несмотря на высокий терапевтический потенциал, максимально эффективному применению силибинина препятствует его низкая растворимость в биологических жидкостях и маслах. Силибинин плохо всасывается эпителием кишечника, что обуславливает его низкую биодоступность [13, 14]. Перспективным путём повышения биодоступности силибинина является его применение в составе липосомных наночастиц. Липосомы, построенные главным образом из фосфолипидов, могут сами по себе выполнять гепатопротекторные функции, определяемые репарационными свойствами фосфолипидов в отношении плазматической мембраны [15]. Включение в их состав силибинина может значительно увеличить его биодоступность и обеспечить проявление максимального гепатопротекторного и противоопухолевого эффекта. Также продемонстрирована антибактериальная активность силибинина в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus epidermidis* [16]. Поэтому представляет интерес исследование антимикробного потенциала липосомного препарата. В связи с этим задачей настоящего исследования являлось получение и характеристика липосомного силибинина, а также исследование его противоопухолевой и антимикробной активности. В настоящей работе мы получили липосомный силибинин и исследовали его противоопухолевую активность на культурах опухолевых клеток линий HepG2 и DU145. Также была исследована антимикробная активность препарата в отношении условно-патогенных микроскопических грибов, а также грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Материал и методы

Материалы. В работе использовали силибинин, L- α -фосфатидилхолин, холестерин, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоную кислоту (HEPES), Твин-80, фосфатно-солевой буфер (PBS), сахарозу, Сефадекс G-50 (Sigma Chemicals Co., США), хлороформ, ацетонитрил, трифторуксусную кислоту, ЭДТА, метанол (PanReac AppliChem, Германия).

Получение липосомной формы силибинина. Липосомы получали методом гидратации тонкослойной плёнки буферным раствором (HEPES) с последующим многократным замораживанием—оттаиванием дисперсии фосфатидилхолин-холестерин-силибинин. На первом этапе готовили отдельно исходные растворы фосфатидилхолина (10 мг/мл), холестерина

(5 мг/мл) и силибинина (10 мг/мл). К смеси фосфатидилхолина и холестерина в хлороформе (молярное соотношение 2:1) добавляли соответствующее количество силибинина. Хлороформ удаляли на ротонном испарителе, в атмосфере азота до формирования тонкой липидной плёнки, которую гидратировали при 65°C добавлением буфера (20 мМ HEPES, pH 7,4), содержащего для увеличения растворимости силибинина детергент твин-80 (1,5% об.) [17]. Дисперсию инкубировали на водяной бане при 50°C в течение 1 ч при встряхивании для получения мультивезикулярных липосом. Суспензию подвергали 7-кратному замораживанию в жидком азоте и оттаиванию на водяной бане при 50°C. Наноразмерные липосомы получали с помощью экструдера Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США), путём семикратного продавливания полученной дисперсии через поликарбонатный ядерный фильтр с размером пор 100 нм.

Определение формы, размера и дзета-потенциала частиц. Изучение формы и размеров полученных липосомных частиц силибинина осуществляли на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6490LV (Япония). Исследуемые пробы покрывались 20 нм (40 с при 40 мА) слоем платины в автоматическом коутере JEOL JFC-1600.

Измерение размеров липосомных частиц и дзета-потенциала проводили методом динамического рассеяния света, или фотонной корреляционной спектроскопии на оборудовании Photocor Compact (Россия), угол рассеяния 90°, лазер 654 нм, 30 мВт [18]. Измерения проводились при температуре 25°C, время накопления корреляционных функций 60 с.

Очистка липосом. Очистку липосомной дисперсии от неключившегося свободного силибинина проводили на гель-фильтрационной колонке с носителем Сефадекс G-50, уравновешенным 20 мМ фосфатно-солевым буфером, pH 7,4, содержащим 5% сахарозы. При очистке наносили 5 мл липосомной дисперсии силибинина. Элюирование препарата липосом проводили тем же буферным раствором при скорости потока 0,8 мл/мин. Процесс очистки контролировали с помощью УФ-детектора при λ 300 нм. Фракции элюата, содержащие липосомный препарат, объединяли и лиофильно высушивали с помощью лиофилизационной сушилки «Alpha 1-2LD plus» (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany). Лиофилизированный препарат липосом хранили при +4°C.

Определение степени включения силибинина в липосомы. Для определения эффективности инкапсулирования силибинина в липосомы использовали метод ВЭЖХ. Суспензию липосом диализовали против PBS. К 100 мкл препарата липосом после диализа добавляли 200 мкл метанола, перемешивали и подвергали обработке ультразвуком в течение 5 мин. Затем образец центрифугировали и отбирали 60 мкл супернатанта для ВЭЖХ-анализа. Анализ проводили с помощью хроматографа Agilent Technologies 1260 Infinity (USA) на обращенно-фазовой колонке C18. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила, содержащего трифторуксусную кислоту (0,1%), при скорости потока 1 мл/мин. Элюат с колонки мониторировали при длине волны 300 нм. Концентрацию силибинина определяли по калибровочному графику, построенному с помощью стандартного образца силибинина. Эффективность включения силибинина в липосомы (Е) рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{\text{Количество силибинина в липосомах, мг}}{\text{Общее количество силибинина, мг}} \times 100\%$$

Исследование динамики высвобождения силибинина из липосом. Изучение динамики высвобождения силибинина проводили с помощью метода диализа [19]. Перед использованием диализные мешки кипятили в 10 мМ ЭДТА в течение 10 мин, промывали и оставляли в деионизированной воде до проведения эксперимента. Липосомную дисперсию (20 мл) в диализном мешке помещали в термостатируемый шейкер и диализировали при 37°C, в течение 70 ч, при перемешивании (50 об/мин) против буферного раствора (20 мМ фосфатно-

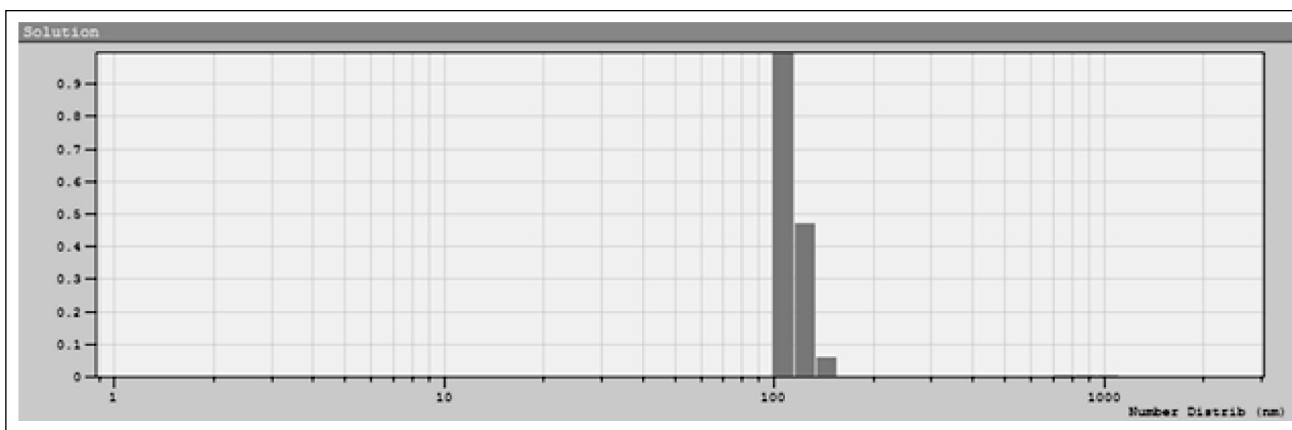


Рис. 1. Распределение частиц липосомного силибинина по размерам, определенное методом динамического рассеяния света.

солевой буфер, pH 7,4), содержащего 1% метанол. В качестве контроля использовали свободный силибинин, который диализировали в аналогичных условиях. Образцы отбирали для анализа через определенные промежутки времени, добавляя к исходному диализному раствору тот же объём свежего буфера. Содержание силибинина в диализате определяли с помощью ВЭЖХ. Все данные приведены как средние значения трёх экспериментов.

Определение цитотоксической активности (ЦТА) липосомного силибинина *in vitro*. В работе использовали опухолевые клетки линий HepG2 (клетки гепатобластомы человека) и DU145 (карцинома простаты человека). Клетки исследуемых линий за 1 сут до эксперимента рассевали в 96-луночные планшеты для микротитрования (Corning, США) в среде для культивирования в плотности 5000–7000 клеток в лунку. Инкубировали клетки с растворами исследуемых препаратов в различных концентрациях в стандартных условиях 72 ч, после чего определяли выживаемость клеток с помощью МТТ-теста согласно методике [20]. ЦТА препарата выражали в единицах IC_{50} (молярная концентрация препарата, вызывающая гибель 50% клеток).

Определение антимикробной активности липосомного силибинина. Антимикробную активность липосомного силибинина оценивали методом диффузии в агар на тест-культурах условно-патогенных грибов и бактерий из коллекции культур НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе. Условно-патогенные грибы принадлежали к микроспорицам рода *Aspergillus*: *A. ustus* 6K, *A. fumigatus* КБП F24, *A. niger* INA 00760; токсигенные виды рода *Penicillium*: *P. chrysogenum* VKM F-4499, *P. brevicompactum* VKM F-4481; дрожжевые условно-патогенные грибы — *Candida albicans* ATCC 2091. Антибактериальное действие определяли с использованием тест-культур штаммов грамположительных *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429 и грамотрицательных бактерий — *E. coli* ATCC 8739. Использовали стерильные бумажные диски (бумага фильтровальная Ф ГОСТ 12026-76), на диск наносили 50 мкл препарата с концентрацией 8,26 мг/мл (413 мкг/диск) и высушивали в стерильных условиях. Высокоактивными считали препараты, у которых зона задержки роста тест-организма составляла 25 мм и более, умеренно активными препаратами считались с зоной задержки роста 10–25 мм и слабоактивными — с зоной менее 10 мм [21]. Для сравнения использовали стандартные диски с нистатином («НИИ Пастера», 40 мкг/мл) и амоксициклом («НИИ Пастера», 10 мкг/мл).

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) липосомного препарата силибинина определяли методом двукратных серийных разведений на штаммах грамположительных бактерий — *Bacillus subtilis* ATCC 6633, и гра-

мотрицательных бактерий — *Escherichia coli* ATCC 8739. Суспензию инокулята тест-организмов разводили в стерильном физиологическом растворе, доводя до оптической плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланд. Эксперименты проводили в жидких средах: мясо-пептонном бульоне с глюкозой (для *Bacillus subtilis* и *B. coagulans* 429) и среде Кесслера (для *Escherichia coli*) с содержанием препарата в среде от 206,5 до 826 мкг/мл в стерильных 2 мл пробирках. МПК определяли как минимальную концентрацию препарата, полностью предотвращающую рост тест-организма [21].

Результаты исследования

Липосомы получали методом гидратации тонкослойной плёнки буферным раствором (HEPES) с последующим многократным замораживанием—оттаиванием дисперсии фосфатидилхолин-холестерин-силибинин. По данным электронной микроскопии липосомы, содержащие силибинин, представляют собой наноразмерные частицы сферической формы.

Средний размер полученных липосомных частиц с включенным в их состав силибинином, определённый с помощью метода динамического светорассеяния, составлял $120,1 \pm 2,4$ нм (рис. 1); дзета-потенциал $-48,2 \pm 1,7$ мВ.

Принято считать, что для обеспечения стабильности и предотвращения агрегации липосомных частиц значения дзета-потенциала должны превышать -30 мВ [22]. Полученные нами липосомные наночастицы силибинина отвечают данному условию, и характеризующий их дзета-потенциал ($-48,7 \pm 1,7$ мВ) является достаточным для обеспечения их стабильности.

Эффективность включения силибинина в липосомы составляла $72,8 \pm 3,5\%$. Описано получение крупных липосом, со средним размером около 700 нм и эффективностью включения флаволигнанов силибинина порядка 65–70% [23, 24]. В настоящей работе были получены липосомы гораздо меньших размеров и при этом достигалась более высокая эффективность включения силибинина.

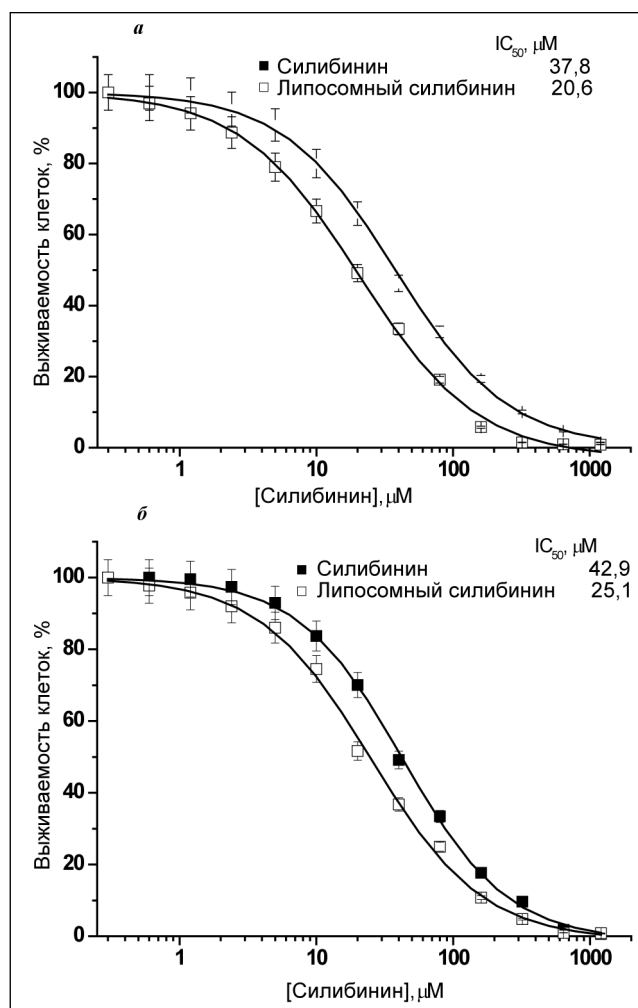


Рис. 2. Цитотоксическая активность липосомной формы силибинина в отношении опухолевых клеток линий HepG2 (а) и DU145 (б).

Результаты исследования цитотоксической активности липосомной формы силибинина в отношении опухолевых клеток линий HepG2 (гепатобластома человека) и DU145 (карцинома простаты человека) представлены на рис. 2.

Препарат липосомного силибинина проявлял дозозависимую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток обеих исследуемых линий. При этом цитотоксическая активность липосомного силибинина заметно превы-

шала активность свободного флаволигнана как в экспериментах с клетками линии HepG2, так и DU145 (см. рис. 2). Цитотоксическая активность (ЦТА) липосомного силибинина в отношении клеток линии HepG2 (IC_{50} 20,6 мкМ) была несколько выше его активности в отношении клеток линии DU145 (IC_{50} 25,1 мкМ). Цитотоксическая активность свободного силибинина в отношении клеток линий HepG2 и DU145, составляла 37,8 мкМ и 42,9 мкМ, соответственно. Цитотоксическое действие силибинина может быть обусловлено подавлением фосфорилирования белков Rb/p107 and Rb2/p130, относящихся к системе ключевых регуляторов клеточного цикла [25]. Более высокая противоопухолевая активность липосомного силибинина, по сравнению со свободным флаволигнаном, а также возможность применения в форме водной нанодисперсии свидетельствует о наличии реальных перспектив для разработки на его основе терапевтических препаратов.

Липосомный силибинин проявил высокую антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в отличие от свободного силибинина, который обладал слабой активностью в отношении грамположительных бактерий. По сведениям D. R. de Oliveira с соавт., свободный силибинин подавляет рост *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 в концентрации 1024 мкг/мл, но не был активен в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922 в этой же концентрации и в сочетании с гентамицином в концентрации до 64 мкг/мл [26].

Липосомный силибинин также обладал фунгистатическим действием в отношении условно-патогенных *A.fumigatus* КБП F24, *A.niger* INA 00760 и токсигенных мицелиальных микромицетов р. *Penicillium*, а также дрожжевых грибов *Candida albicans* ATCC 2091 в концентрации 413 мкг препарата/диск (табл. 1).

D. G. Yun с соавт. было показано, что препарат свободного силибинина способен влиять на проницаемость мембраны у *Candida albicans* ATCC 90028, вызывая апоптоз, а также снижать метаболическую активность клеток, препятствуя формированию биопленок в концентрациях от 400 до 800 мкг/мл [27].

Таблица 1. Антимикробная активность препаратов силибинина в отношении условно-патогенных грибов и бактерий (диаметр зоны угнетения роста, мм)

Тест-организм	Свободный силибинин	Липосомный силибинин	Нистатин	Амоксилав
<i>Aspergillus fumigatus</i> КБП F24	0	10	25	—
<i>A.austus</i> 6K	0	0	21	—
<i>A.niger</i> INA 00760	0	9	15	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	0	10	25	—
<i>Penicillium brevicompactum</i> VKM F-4481	0	12	22	—
<i>P.chrysogenum</i> VKM F-4499	0	11	24	—
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	9	17	—	30
<i>B.coagulans</i> 429	8	15	—	25
<i>E.coli</i> ATCC 8739	0	24	—	21

Таблица 2. Минимальная подавляющая концентрация исходного и липосомного силибинина в отношении тест-культур бактерий, дрожжевых и мицелиальных грибов

Препарат силибинина	МПК, мкг/мл				
	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>B.coagulans</i> 429	<i>C.albicans</i> ATCC 14053	<i>A.niger</i> ATCC 16404	<i>E.coli</i> ATCC 8739
Исходный	206,5	413	Н/а	Н/а	826
Липосомный	206,5	206,5	Н/а	Н/а	413

Примечание. Н/а — неактивен.

Была определена МПК в отношении условно-патогенных грибов и бактерий методом двукратных серийных разведений (табл. 2).

Установлено, что липосомный препарат силибинина в концентрации 206,5 мкг/мл полностью ингибировал *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *B.coagulans* 429, что свидетельствует о высокой активности. МПК для грамотрицательных бактерий составляет 413 мкг/мл, соответственно. При этом как свободный силибинин, так и липосомный препарат не оказывали выраженного фунгицидного действия в отношении *A.niger* ATCC 16404 и *Candida albicans* ATCC 2091 в концентрации до 826 мкг/мл.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что липосомный силибинин оказывает ингибирующий эффект в отношении злокачественных клеток печени, что наряду с ранее описанным гепатопротекторным действием силибинина свидетельствует о возможном комплексном терапевтическом воздействии на печень при использовании липосомных форм флаволигнанов. Ингибирование роста клеток карциномы простаты также свидетельствует об имеющихся перспективах раз-

работки противоопухолевых препаратов на основе липосомного силибинина, которые могли бы найти применение в терапии злокачественных новообразований предстательной железы. К преимуществам применения липосомного силибинина также относится возможность разработки на его основе инъекционных и трансдермальных лекарственных форм. В отличие от липосомного, свободный силибинин характеризуется низкой водорастворимостью, что значительно снижает возможности его эффективного терапевтического применения. Применение липосомного силибинина в противоопухолевой терапии может обеспечить высокий уровень накопления препарата в опухолевой ткани благодаря эффекту «пассивного нацеливания», связанного с аномальным развитием и высокой проницаемостью опухолевых кровеносных сосудов для липосомных частиц. Кроме того, липосомный силибинин оказывает выраженное антибактериальное действие в отношении бактерий и фунгистатическое действие в отношении токсигенных микромицетов, что может свидетельствовать о его эффективности как антимикробного средства и фунгистатика для снижения негативного действия микотоксинов плесневых грибов.

ЛИТЕРАТУРА

- Abenavoli L., Capasso R., Milic N., Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res* 2010; 24 (10): 1423–1432.
- Féher J., Lengyel G. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13 (1): 210–217.
- Vargas-Mendoza N., Madrigal-Santillán E., Morales-González A., Esquivel-Soto J., Esquivel-Chirino C., García-Luna Y. et al. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol* 2014; 6 (3): 144–149.
- Miguez M.P., Anundi I., Sainz-Pardo L.A., Lindros K.O. Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact* 1994; 91 (1): 51–63.
- Ilic Z., Crawford D., Vakharia D., Egner P.A., Sell S. Glutathione-S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B1. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 242 (3): 241–246.
- Rastogi R., Srivastava A.K., Rastogi A.K. Long term effect of aflatoxin B(1) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of picroliv and silymarin. *Phytother Res* 2001; 15 (4): 307–310.
- Gazák R., Walterová D., Kren V. Silybin and silymarin — new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* 2007; 14 (3): 315–338.
- Singh R.P., Tyagi A.K., Zhao J., Agarwal R. Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 2002; 23 (3): 499–510.
- Wang Y.X., Cai H., Jiang G., Zhou T.B., Wu H. Silibinin inhibits proliferation, induces apoptosis and causes cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via STAT3 pathway inhibition. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15 (16): 6791–6798.
- Woo S.M., Min K.J., Kim S., Park J.W., Kim D.E. et al. Silibinin induces apoptosis of HT29 colon carcinoma cells through early growth response-1 (EGR-1)-mediated non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) up-regulation. *Chem Biol Interact* 2014; 211: 36–43.
- Pirouzpanah M.B., Sabzichi M., Pirouzpanah S., Chavoshi H., Samadi N. Silibinin induces apoptosis in breast cancer cells by modulating p53, p21, Bak and Bcl-XL pathways. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16 (5): 2087–2092.
- Bayram D., Çetin E.S., Kara M., Özgöçmen M., Candan I.A. The apoptotic effects of silibinin on MDA-MB-231 and MCF-7 human breast carcinoma cells. *Hum Exp Toxicol* 2017; 36 (6): 573–586.
- Wang Y., Zhang L., Wang Q., Zhang D. Recent advances in the nanotechnology-based drug delivery of Silybin. *J Biomed Nanotechnol* 2014; 10 (4): 543–558.
- Song Y., Zhuang J., Guo J., Xiao Y., Ping Q. Preparation and properties of a silybin-phospholipid complex. *Pharmazie* 2008; 63 (1): 35–42.
- Na J.Y., Song K., Kim S., Kwon J. Hepatoprotective effect of phosphatidylcholine against carbon tetrachloride liver damage in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 460 (2): 308–313.
- Lee D.G., Kim H.K., Park Y., Park S.C., Woo E.R. et al. Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*. *Arch Pharm Res* 2003; 26 (8): 597–600.
- Yang T., Cui F.D., Choi M.K., Cho J.W., Chung S.J. et al. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm* 2007; 338 (1–2): 317–326.
- Robertson A.E., Phan D.H., Macaluso J.E., Kuryakov V.N., Jouravleva E.V. et al. Mesoscale solubilization and critical phenomena in binary and quasi-binary solutions of hydrotropes. *Fluid Phase Equilibria* 2016; 407 (15): 243–254.
- Zhang X., Lu S., Han J., Sun S., Wang L. et al. Preparation, characterization and *in vivo* distribution of solid lipid nanoparticles loaded with syringopicroside. *Pharmazie* 2011; 66: 404–407.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55–63.

21. *Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K.* Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal* 2016; 6 (2): 71—79.
22. *Ochi M.M., Amoabediny G., Rezayat S.M., Akbarzadeh A., Ebrahimi B.* *In Vitro* Co-Delivery evaluation of novel pegylated nano-liposomal herbal drugs of silibinin and glycyrrhizic acid (nano-phytosome) to hepatocellular carcinoma cells. *Cell J* 2016; 18 (2): 135—148.
23. *El-Samaily M.S., Afifi N.N., Mahmoud E.A.* Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and *in vivo* performance. *Int J Pharm* 2006; 319 (1—2): 121—129.
24. *El-Samaily M.S., Afifi N.N., Mahmoud E.A.* Increasing bioavailability of silymarin using a buccal liposomal delivery system: preparation and experimental design investigation. *Int J Pharm* 2006; 308 (1—2): 140—148.
25. *Tyagi A., Agarwal C., Agarwal R.* Inhibition of retinoblastoma protein (Rb) phosphorylation at serine sites and an increase in Rb-E2F complex formation by silibinin in androgen-dependent human prostate carcinoma LNCaP cells: role in prostate cancer prevention. *Mol Cancer Ther* 2002; 1 (7): 525—532.
26. *de Oliveira D. R., Tintino S. R., Braga M. F., Boligon A. A., Athayde M. L. et. al.* *In Vitro* Antimicrobial and Modulatory Activity of the Natural Products Silymarin and Silibinin. *Bio Med Research International* Vol. 2015 PP. 1—7.
27. *Yun D.G., Lee D.G.* Assessment of Silibinin as a Potential Antifungal Agent and Investigation of Its Mechanism of Action. *IUBMB LIFE* 2017; 69 (8): 631—637.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фельдман Наталия Борисовна — д. б. н., профессор кафедры биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Гудкова Оксана Игоревна — студент кафедры биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Курьяков Владимир Николаевич — научный сотрудник Института проблем нефти и газа РАН, Москва

Громовых Татьяна Ильинична — д.б.н., профессор кафедры биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Баранова Анна Александровна — аспирант лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Садыкова Вера Сергеевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Луценко Сергей Викторович — д. б. н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов в ответ на воздействие β -лактамаз расширенного спектра (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*)

*О. А. КОЛЕНЧУКОВА^{1,2}, Н. И. САРМАТОВА², А. В. МОШЕВ¹

¹ НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

² Институт биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета Минобрнауки РФ, Красноярск

Phagocytic Activity of Neutrophilic Granulocytes in Response to the Effect of Extended-Spectrum β -Lactamases (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*)

*O. A. KOLENCHUKOVA^{1,2}, N. I. SARMATOVA², A. V. MOSHEV¹

¹ Scientific Research Institute of Medical Problems of the North of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk

² Institute of Biology and Biotechnology of the Siberian Federal University, Krasnoyarsk

Исследование посвящено изучению фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии антибиотикорезистентных штаммов бактерий *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, относящихся к β -лактамазам расширенного спектра. Объектами исследования служили нейтрофильные гранулоциты крови, выделенные у здоровых людей, и штаммы бактерий *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* резистентные и чувствительные к антибиотикам. Функции фагоцитоза (фагоцитарное число и фагоцитарный индекс) оценивали с помощью FITC (Fluorescein Isothyocyanate) — меченых бактерий. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA) в цельной периферической крови. Обнаружен различный фагоцитарный ответ нейтрофилов на устойчивые и чувствительные штаммы бактерий. Так, в ответ на резистентные штаммы *S. aureus*, процент нейтрофилов, вступивших в фагоцитоз и среднее число бактерий, находящихся внутриклеточно, увеличивается относительно чувствительных штаммов. В ответ на резистентные штаммы *K. pneumoniae* происходит снижение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов. При индукции нейтрофильных гранулоцитов резистентными штаммами *P. aeruginosa* не получено достоверных различий относительно чувствительных.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, нейтрофильные гранулоциты, фагоцитоз, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

The study investigates the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes under the influence of antibiotic-resistant strains of bacteria *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* belonging to extended-spectrum β -lactamases. The subjects of the study were neutrophilic granulocytes of blood isolated from healthy people and strains of bacteria *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* resistant and sensitive to antibiotics. The functions of phagocytosis (phagocytic number and phagocytic index) were assessed with the help of FITC (Fluorescein Isothyocyanate) — labeled bacteria. The analysis of stained cells was carried out on flow cytometer FC-500 (BeckmanCoulter, USA) in whole peripheral blood. A different phagocytic response of neutrophils to resistant and sensitive strains of bacteria was detected. Thus, in response to resistant strains of *S. aureus*, the percentage of neutrophils entering phagocytosis and the average number of intracellular bacteria increases with respect to sensitive strains. In response to resistant strains of *K. pneumoniae*, the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes decreases. When neutrophil granulocytes were induced, resistant strains of *P. aeruginosa* did not show significant differences with respect to sensitive strains.

Keywords: antibiotic resistance, neutrophilic granulocytes, phagocytosis, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

Введение

Внедрение в медицинскую практику новых химиотерапевтических средств и антибиотиков широкого спектра действия создало перспективы для успешного лечения многих заболеваний мик-

робной этиологии. Однако со временем практическая ценность первично эффективных химиотерапевтических средств резко снизилась, поскольку произошло повсеместное распространение резистентных микроорганизмов. В настоящее время основными проблемными микроорганизмами во всем мире являются продуценты β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС), к которым относят нозокомиальные штаммы *Klebsiella* spp., нефер-

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

ментирующие грамтрицательные палочки, включая *Pseudomonas aeruginosa*, а также метициллинорезистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) [1]. По результатам исследования микробиологического профиля отделения хирургической реанимации и интенсивной терапии за 2015 г. выявлено, что наиболее часто выделяемыми микроорганизмами являются золотистый стафилококк — 18%, клебсиелла (*K.pneumoniae*) — 13%; синегнойная палочка (*P.aeruginosa*) — 7%. При этом среди всех золотистых стафилококков (*S.aureus*) число MRSA равно 81,5% [2—4]. У бактерий развитие устойчивости к антибиотикам связано с синтезом ферментов, разрушающих препарат, что в свою очередь ведёт к изменению клеточной проницаемости, перестройке метаболических процессов и рецепторного аппарата [1]. Нейтрофильные гранулоциты оснащены широким набором рецепторов, которые позволяют чутко и дифференцированно реагировать на малейшие изменения в бактериальной клетке [5, 6]. Клеточная мембрана опосредует взаимосвязь нейтрофилов с экстрацеллюлярным окружением. На ней экспрессируется комплекс адгезионных молекул и рецепторов к различным лигандам. Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов находится в непосредственной зависимости от количества и плотности распределения на поверхности клеточной мембраны таких рецепторов, как CD11b/CD18 (рецептор комплемента, CR3), CD16 (Fc-рецептор III типа), CD32 (FcγRIIA), CD95 (Fas/APO1) — проапоптотический маркер (Fas-рецептор), CD64 (FcγRI) [6—8].

Таким образом целью исследования является изучение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии антибиотикорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*.

Материал и методы

Объектами исследования служили нейтрофильные гранулоциты крови, выделенные у 25 практически здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет. Использовались штаммы *P.aeruginosa*, устойчивые к амикацину, гентамицину, имипенему, меропенему, пиперациллину (тазобактаму), тикарциллину (клавулановой кислоте), цефепиму, цефоперазону, цефтазидиму, ципрофлоксацину; штаммы *S.aureus*, устойчивые к действию оксациллина (метициллина) (MRSA); штаммы *K.pneumoniae*, устойчивые к амикацину, гентамицину, цефотаксиму, цефтазидиму, ципрофлоксацину. В качестве контроля использовали штаммы *P.aeruginosa*; *S.aureus* (MSSA); *K.pneumoniae*, чувствительные к действию вышеуказанных антибиотиков в тех же концентрациях.

Выявление металло-β-лактамаз *P.aeruginosa* проводили с помощью фенотипического метода двойных дисков с ЭДТА. Для выявления устойчивости штаммов *S.aureus* методом скрининга использовали агар Мюллера—Хинтон, содержащий 4% NaCl и 6,0 мкг/мл оксациллина. Выявление β-лактамаз расширенного спектра у *K.pneumoniae* проводили методом двойных дисков.

Исследование фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов проводили методом проточной цитометрии с ис-

пользованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченых PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD14-PE/CD45-ECD/HLA-DR-PC5/CD16-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [9]. Подготовку образцов периферической крови для анализа осуществляли по стандартной методике [9]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA) [9]. В каждой пробе анализировали не менее 50000 нейтрофилов. Уровень фагоцитоза определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченых (fluorescein isothiocyanate) бактериальных штаммов [5]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к бактериальному штамму (разведённому в бикарбонатном буфере, pH = 9,0) добавляли FITC (предварительно растворённый в ДМСО до концентрации 1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 1 ч, трижды отмывали и по стандарту мутности доводили концентрацию бактерий до 1 млн кл./мл. К 100 мкл гепаринизированной крови добавляли 10 мкл FITC-меченой суспензии штаммов и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Для гашения адгезированных на поверхности нейтрофилов FITC-меченых бактерий к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, USA). В каждой пробе анализировали не менее 50000 нейтрофилов. Подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (определяли как фагоцитарный индекс — ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число — ФЧ) [9].

Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₂₅ и Q₇₅). Достоверность различий между показателями зависимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона. Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты и обсуждение

Для большинства антибиотиков, применяемых в клинике, процессы, формирующие устойчивость, в основном изучены, и они во многом определяют структуру антибиотика, механизм действия на клетку и особенностями микроорганизмов. Между тем в целом ряде случаев появление устойчивости связано одновременно с несколькими механизмами, что указывает на сложный, многофакторный характер перестройки метаболизма бактериальной клетки, в который вовлекается множество ферментных систем [10]. Поскольку взаимодействие между нейтрофилом и микроорганизмом происходит по типу рецептор-лиганд, и это взаимодействие инициирует процесс поглощения, активируя двигательный аппарат клетки. Перестройка ферментативной системы бактериальной клетки может повлиять на активность фагоцитоза [11].

При исследовании фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов в ответ на воздействие антибиотикорезистентных и чувствительных бактериальных штаммов *P.aeruginosa*,

Таблица 1. Показатели фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов крови при воздействии штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

Показатели	Чувствительный штамм	Устойчивый штамм	<i>p</i>
ФИ общей популяции нейтрофильных гранулоцитов, (%)	91,9 (88,9–97,5)	95,1 (89,5–97,2)	
ФЧ общей популяции нейтрофильных гранулоцитов, (отн. ед.)	30,9 (25,3–32,8)	22,7 (18,4–30,7)	
ФИ фагоцитирующей популяции клеток, (%)	50,1 (37,1–58,3)	49,9 (43,6–55,3)	
ФЧ фагоцитирующей популяции клеток, (отн. ед.)	52,8 (48,0–69,5)	40,6 (33,1–60,5)	0,03
ФИ слабофагоцитирующей популяции клеток, (%)	38,8 (34,0–49,6)	41,3 (33,7–44,6)	
ФЧ слабофагоцитирующей популяции клеток, (отн. ед.)	2,5 (2,3–5,1)	2,5 (2,2–3,1)	

Таблица 2. Показатели фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов крови при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Чувствительный штамм	Устойчивый штамм	<i>p</i>
ФИ общей популяции нейтрофильных гранулоцитов, (%)	84,1 (67,4–94,2)	90,1 (82,6–91,4)	
ФЧ общей популяции нейтрофильных гранулоцитов, (отн. ед.)	8,7 (5,8–39,5)	52,8 (12,3–99,1)	<0,001
ФИ фагоцитирующей популяции клеток, (%)	5,2 (3,5–14,2)	39,4 (12,3–58,5)	<0,001
ФЧ фагоцитирующей популяции клеток, (отн. ед.)	121,0 (112,0–143,0)	123,0 (88,1–144,0)	
ФИ слабофагоцитирующей популяции клеток, (%)	78,2 (67,5–84,4)	45,0 (33,8–75,0)	<0,001
ФЧ слабофагоцитирующей популяции клеток, (отн. ед.)	1,8 (1,6–2,3)	1,9 (1,7–2,6)	<0,001

S.aureus и *K.pneumoniae* было обнаружено разделение клеток на две субпопуляции — с высокими и низкими показателями светорассеяния. Субпопуляции нейтрофилов различаются по экспрессии на своей поверхности рецепторов CD64, CD32, CD11b, осуществляющих фагоцитарную и регуляторную функции [6]. Нейтрофилы реализуют свой эффекторный потенциал не только посредством фагоцитоза, но и секрецией растворимых регуляторных продуктов, таких как лейкотриены, простагландины, интерфероны, интерлейкины, активные формы кислорода.

Оценка активности нейтрофилов в ответ на индукцию резистентными штаммами *P.aeruginosa* (относительно чувствительных штаммов) показала снижение фагоцитарного числа в общей популяции фагоцитирующих клеток (табл. 1). Синегнойная палочка принадлежит к грамотрицательным аэробным неспорообразующим бактериям. Бактерии подвижны и имеют форму прямых или изогнутых палочек длиной от 1 до 5 мкм и диаметром от 0,5 до 1,0 мкм. Факторами патогенности *P.aeruginosa* являются наличие подвижности, токсинообразование и продукция гидролитических ферментов. При этом синегнойная палочка является патогенным микроорганизмом и одним из распространённых возбудителей нозокомиальных инфекций, поскольку особенно легко поражает лиц с ослабленным иммунитетом [12].

Золотистый стафилококк относится к грамположительной микрофлоре, имеет форму кокков диаметром 0,5–1,5 мкм, относится к факультативным анаэробам и является условно-патогенным микроорганизмом. Многие бактерии выработали механизмы защиты от опсонизации и последующего фагоцитоза нейтрофилами [2, 5]. У штаммов *S.aureus* факторами снижающими эффективность фагоцитоза или препятствующих ему являются компоненты клеточной стенки: пептидогликаны и белок А [10, 13]. Исследование фагоцитарной ак-

тивности нейтрофильных гранулоцитов в ответ на воздействие MRSA показало увеличение фагоцитарного числа общей популяции клеток, фагоцитарного индекса активно фагоцитирующих клеток и фагоцитарного числа слабофагоцитирующих нейтрофилов при снижении фагоцитарного индекса слабофагоцитирующих клеток (табл. 2).

Штаммы *K.pneumoniae* представляют грамотрицательную факультативно-анаэробную, условно-патогенную микрофлору. Имеют вид небольшой округлой палочки размером 0,5–0,8 на 1–2 мкм. В основном, механизмы защиты бактерий от фагоцитоза сопряжены с бактериальной капсулой. Штаммы *K.pneumoniae* имеют на своей поверхности полисахаридную капсулу. Капсула защищает бактерии от нейтрофилов, препятствуя опсонизации. Штаммы этих же бактерий, лишенные капсулы, обладают меньшей вирулентностью. Капсула слабоиммуногенна и маскирует структуры бактериальной стенки, которые обладают большей иммуногенностью и могут непосредственно активировать систему комплемента [4, 14]. Анализ фагоцитарной активности нейтрофилов в ответ на воздействие штаммов *K.pneumoniae*, устойчивых к действию антибиотиков, показал увеличение фагоцитарного индекса общей популяции клеток, при снижении фагоцитарного индекса популяции нейтрофилов, ответственной за фагоцитоз, и слабофагоцитирующих клеток, ответственных за регуляторные механизмы. При этом фагоцитарное число фагоцитирующей субпопуляции клеток также достоверно снижено относительно чувствительных штаммов (табл. 3).

Заключение

Анализируя результаты исследования можно отметить различия, полученные при индукции нейтрофильных гранулоцитов устойчивыми и чувствительными штаммами БЛРС. Так, в ответ на MRSA процент нейтрофилов, вступивших в фагоцитоз и среднее число бактерий, располо-

Таблица 3. Показатели фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов крови при воздействии штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Показатели	Чувствительный штамм	Устойчивый штамм	<i>p</i>
ФИ общей популяции нейтрофильных гранулоцитов, (%)	79,1 (75,0—85,5)	80,5 (72,8—88,1)	0,035
ФЧ общей популяции нейтрофильных гранулоцитов, (отн. ед.)	19,7 (16,7—39,6)	21,3 (20,5—21,7)	
ФИ фагоцитирующей популяции клеток, (%)	34,1 (27,0—41,0)	30,5 (17,3—32,0)	0,047
ФЧ фагоцитирующей популяции клеток, (отн. ед.)	52,9 (39,9—62,9)	38,7 (32,9—40,7)	0,035
ФИ слабофагоцитирующей популяции клеток, (%)	43,2 (29,4—46,7)	27,1 (25,2—37,1)	0,004
ФЧ слабофагоцитирующей популяции клеток, (отн. ед.)	5,4 (4,4—11,6)	4,7 (3,8—5,9)	

женных внутриклеточно, увеличивается относительно чувствительных штаммов. В ответ на резистентные штаммы *K.pneumoniae* наблюдается обратная ситуация, происходит снижение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов. Различия в фагоцитарном ответе могут быть связаны с особенностями строения и жизнедеятельности бактерий (штаммы *K.pneumoniae* относятся к грамотрицательным бактериям, имеющим форму палочек, *S.aureus* — грамположительные кокки). Так же можно отметить, что штаммы *K.pneumoniae* и *S.aureus* относятся к условно-патогенным микроорганизмам, при этом *K.pneumoniae* входит в состав нормофлоры верхних дыхательных путей. Бактерия *P.aeruginosa* относится к патогенной микрофлоре, в норме, не заселяющей

ЛИТЕРАТУРА

1. Стречунский Л.С. β-лактамазы расширенного спектра — быстро растущая и плохо осознаваемая угроза. Клинико-микробиологический обзор. — 2005. — №1(7). — С. 92—96. / Strachunskij L.S. β-laktamazy rasshirennoho spektra — bystro rastushhaja i plokhoo soznavaemaja ugroza. Klin mikrobiol antimikrob khimioter. 2005; 1 (7): 92—96. [in Russian]
2. Shahkarami F., Rashki A., Rashki Ghalehnoo Z., Jundishapur J. Susceptibility and plasmid profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S.aureus*. Microbiol 2014 Jul; 7 (7): e16984.
3. Genestet C., Le Gouellec A., Chaker H., Polack B., Guery B., Toussaint B., Stasia M.J. Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. Free Radic Biol Med 2014 Aug; 73: 400—10.
4. Chun-Hsiang Chiu, Kuo-Ming Yeh, Leung-Kei Siu, Chang-Phone Fung, Jung-Chung Lin, Feng-Yee Chang. Impact of age on neutrophil phagocytic reaction with different capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. J Microbiol Immunol Infect 2011; 44: 333—337.
5. Коленчукова О.А., Сарматова Н.И. Механизмы воздействия устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus* на функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов. Антибиотики и химиотерапия. — 2014. — Т. 59. — № 11. — С. 20—23. / Kolenchukova O.A., Sarmatova N.I. Mekhanizmy vozdejstvija ustojchivyx k metitsillinu shtamov *Staphylococcus aureus* na funkcionall'noe sostojanie nejtrofil'nykh granulocitov. Antibiotiki i khimioter 2014; 59 (11): 20—23. [in Russian]
6. Нестерова И. В., Швыдченко И. Н., Фомичева Е. В., Синельникова Е. Ю., Роменская В. А., Рожкова Г. Г., Фесенко И. В. Фенотипические и функциональные характеристики нейтрофильных гранулоцитов человека в норме. Наука Кубани. — 2007. — № 4. — С. 38—43. / Nesterova I. V., Shvydchenko I. N., Fomicheva E. V., Sinelnikova E. Ju., Romenskaja V. A., Rozhkova G. G., Fesenko I. V. Fenotipicheskie i funkcionall'nye kharakteristiki nejtrofil'nykh granulocitov cheloveka v norme. Nauka Kubani. 2007; 4: 38—43. [in Russian]
7. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Микробиоценоз слизистой оболочки носа и риносинуситы. Красноярск, 2011. — 180. / Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Mikrobiocenozy slizistoj obolochki nosa i rinosinusity. Krasnojarsk, 2011; 180. [in Russian]
8. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом. Медицинская иммунология. — 2010. — Т. 12. — № 4—5. — С. 437—440. / Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Osobennosti ljuminol- i ljucigenin-zavisimoj khemiljuminescencii nejtrofil'nykh granulocitov u bol'nykh khronicheskim rinosinusitom // Medicinskaja immunologija, 2010; 12 (4—5): 437—440. [in Russian]
9. Luider J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. Lab Hematol 2004; 10: 102—108.
10. Yang Z, Fu Y, Liu B, Zhou E, Liu Z, Song X, Li D, Zhang N. Ferrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. Microb Pathog 2013 Dec; 65: 1—6.
11. Flack C.E., Zurek O.W., Meishery D.D., Pallister K.B., Malone C.L., Horswill A.R., Voyich J.M. Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil-derived stimuli. Proc Natl Acad Sci USA 2014 May 13; 111 (19): e2037—45.
12. Martin C., Ohayon D., Alkan M., Mocek J., Pedersoli-Ribeil M., Candalh C., Thevenot G., Millet A., Tamassia N., Cassatella M.A., Thieblemont N., Burgel P.R., Witko-Sarsat V. Neutrophil-Expressed p21/waf1 Favors Inflammation Resolution in *Pseudomonas aeruginosa* Infection. Am J Respir Cell Mol Biol 2016 May; 54 (5): 740—750.
13. Swe P.M., Fischer K. A scabies mite serpin interferes with complement-mediated neutrophil functions and promotes staphylococcal growth. PLoS Negl Trop Dis 2014 Jun 19; 8 (6).
14. Jondle C.N., Sharma A., Simonson T.J., Larson B., Mishra B.B., Sharma J. Macrophage Galactose-Type Lectin-1 Deficiency Is Associated with Increased Neutrophilia and Hyperinflammation in Gram-Negative Pneumonia. J Immunol 2016 Apr 1; 196 (7): 3088—3096.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Коленчукова Оксана Александровна — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» ФАНО РФ, профессор кафедры биофизики института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, Минобрнауки РФ, Красноярск

Сарматова Наталья Ивановна — к.б.н., доцент кафедры биотехнологии института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, Минобрнауки РФ, Красноярск

Мошеев Антон Викторович — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», ФАНО РФ, Красноярск

Этиологическая структура и антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей в Санкт-Петербурге, 2013—2015 гг.

О. А. КАМЕНЕВА¹, С. Е. МОРОЗОВА¹, О. Е. ПУНЧЕНКО², К. Г. КОСЯКОВА^{1,2}, *С. В. СИДОРЕНКО^{2,3}

¹ Детская городская больница № 22, Санкт-Петербург

² СЗГМУ им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

³ НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург

The Etiological Structure and Antibiotic Resistance of Pathogens of Community-Acquired Infections of the Urinary Tract in St. Petersburg, 2013—2015

O. A. KAMENEVA¹, S. E. MOROZOVA¹, O. E. PUNCHENKO², K. G. KOSYAKOVA^{1,2}, *S. V. SIDORENKO^{2,3}

¹ City Children's Hospital No. 22, St. Petersburg

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

³ Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

Проведён ретроспективный анализ результатов диагностики инфекций мочевыводящих путей и антибиотикочувствительности патогенов, выделенных от пациентов амбулаторно-поликлинических организаций в 2013—2015 гг. 1118 изолятов (76,6%) были выделены от женщин в возрасте от 18 до 91 года (средний возраст $46,3 \pm 22,2$ лет) и 341 (23,4%) — от мужчин в возрасте от 19 до 85 лет (средний возраст $52,1 \pm 19,7$ лет). Среди 1459 уропатогенов преобладали представители семейства Enterobacteriaceae (77,0%), реже выделялись грамположительные бактерии (18,3%) и неферментирующие грамотрицательные бактерии (4,2%). Наименьший уровень устойчивости проявляли изоляты *E.coli*: к ампициллину были устойчивы 45,7% изолятов, ингибиторозащищённым пенициллинам — 39,7%, фторхинолонам — до 21,7%, цефалоспорином III—IV — 17,5—18,7%, аминогликозидам — до 10,7%. Наряду с карбапенемами, высокую активность в отношении *Escherichia coli* сохранил нитрофурантоин, к которому оказались нечувствительными лишь 7,0% изолятов. Наибольший уровень резистентности выявлен среди энтеробактерий группы *Citrobacter freundii*, *Morganella* spp., *Serratia* spp., *Cedecea* spp., *Providencia* spp. Устойчивость к оксациллину проявляли более 40% как *Staphylococcus aureus*, так и коагулазонегативных стафилококков. В качестве наиболее благоприятной тенденции следует рассматривать распространение среди Enterobacteriaceae устойчивости к цефалоспорином III—IV поколений, что вероятно связано с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра.

Ключевые слова: инфекции мочевыводящих путей, уропатогены, Enterobacteriaceae, антибиотикорезистентность.

A retrospective analysis of the results of diagnosis of urinary tract infections and antibiotic susceptibility of pathogens isolated from patients from outpatient clinics in 2013—2015 was conducted. 1118 isolates (76.6%) were obtained from women aged 18 to 91 years (mean age 46.3 ± 22.2 years) and 341 (23.4%) from men aged 19 to 85 years (mean age 52.1 ± 19.7 years). Among 1459 uropathogens, representatives of the Enterobacteriaceae family (77.0%) prevailed, while, gram-positive bacteria (18.3%) and non-fermenting gram-negative bacteria (4.2%) were less common. The lowest level of resistance was exhibited by isolates of *E.coli*: 45.7% of isolates were resistant to ampicillin, 39.7% — to inhibitor-protected penicillins, up to 21.7% — to fluoroquinolones, 17.5—18.7% — to cephalosporins, up to 10.7% — to aminoglycosides. Along with carbapenems, high activity against *Escherichia coli* was retained by nitrofurantoin, to which only 7.0% of isolates were insensitive. The greatest level of resistance was detected among enterobacteria of *Citrobacter freundii*, *Morganella* spp., *Serratia* spp., *Cedecea* spp., *Providencia* spp. Resistance to oxacillin showed more than 40% of both *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. The spread of resistance to cephalosporins of III—IV generations among Enterobacteriaceae should be considered as the most unfavorable trend, which is probably associated with production of extended-spectrum beta-lactamases.

Keywords: urinary tract infections, uropathogens, Enterobacteriaceae, antibiotic resistance.

Введение

Рациональная терапия внебольничных инфекций мочевыводящих путей (ИМП) основывается на этиологической расшифровке диагноза и определении чувствительности уропатогенов к

антимикробным препаратам (АМП). Наиболее современная классификация ИМП, основанная на учёте анатомической локализации инфекционного процесса, его клинической картины и характера (осложнённый или неосложнённый), тяжести течения, наличия факторов риска, способствующих развитию или тяжёлому течению инфекции [1], недостаточно опробована в клинической практике.

© Коллектив авторов, 2017

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

Для практических целей обоснования эмпирической этиотропной терапии широко применяется подход, основанный на выделении двух больших групп: внебольничных и госпитальных ИМП, различающихся по этиологии и антибиотикочувствительности возбудителей. Однако развитие медицинских технологий затрудняет использование чисто эпидемиологических критериев (место и время возникновения инфекции) для дифференцировки указанных групп. Возрастает количество пациентов с хроническими и рекуррентными формами инфекций, которые получают медицинскую помощь в амбулаторных условиях, а также пациентов, которые выписываются из стационаров после краткосрочной госпитализации. Для характеристики таких инфекций предложен термин «community onset healthcare-associated urinary tract infection» (внебольнично развившиеся инфекции МВП, связанные с оказанием медицинской помощи) [2].

По данным различных исследований, основным возбудителем внебольничных ИМП является *Escherichia coli* (70–95%), реже встречаются *Proteus* spp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella* spp. и другие энтеробактерии [3, 4]. Сопоставимые данные об этиологической структуре ИМП были получены в ряде исследований, выполненных в Российской Федерации [5, 6]. Для молодых лиц характерна несколько большая роль *S.saprophyticus*, а для пожилых — *Proteus* spp. При наличии сопутствующих заболеваний (сахарный диабет, повреждения спинного мозга) возрастает этиологическая роль менее вирулентных бактерий: *Candida* spp., *Enterococcus* spp. Оценка их этиологической значимости остаётся крайне субъективным процессом.

Назначение этиотропной терапии при внебольничных ИМП практически всегда происходит эмпирически, что повышает требования к периодически проводимым региональным или многоцентровым исследованиям антибиотикорезистентности возбудителей.

Цель исследования — изучение динамики этиологической структуры и антибиотикорезистентности микроорганизмов, выделенных при внебольничных инфекциях мочевыводящих путей у взрослых.

Материал и методы

Проанализированы 1459 внебольничных изолятов уропатогенов, выделенных от пациентов 7 амбулаторно-поликлинических организаций Колпинского района г. Санкт-Петербурга в 2013–2015 гг. В исследование включались изоляты от взрослых пациентов с внебольничными ИМП, выделенные в диагностически значимом титре, согласно рекомендациям Европейской урологической ассоциации [1]. Среди протестированных штаммов уропатогенов 1118 (76,6%) были выделены от женщин в возрасте от 18 до 91 года (средний возраст 46,3±22,2 лет) и 341 (23,4%) — от мужчин в возрасте от 19 до 85 лет (средний возраст 52,1±19,7 лет). В табл. 1 представлены диагнозы направления образцов мочи.

Клинический материал для исследования собирали после туалета половых органов в виде средней порции утренней свободно выпущенной мочи либо мочевым катетером. Бактериологическое исследование выполняли количественным методом с использованием стандартизованных питательных сред. Идентификацию уропатогенов и определение чувствительности к АМП проводили с помощью прибора MicroScan WalkAway Plus System (Siemens, США) и панелей Neg Breakpoint Combo 41, Pos Breakpoint Combo 20 (Siemens, США) в соответствии с критериями CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) [7]. Чувствительность микроорганизмов к антимикробным препаратам описывали термином «чувствительный», а «умеренно резистентные» и «устойчивые» изоляты объединяли под термином «нечувствительные». Продукцию бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) у выделенных изолятов регистрировали при не менее чем 4-кратном снижении МПК цефотаксима, цефтазидима или цефепима в присутствии клавулановой кислоты (4 мг/л) [7]. Внутренний контроль качества определения чувствительности к антимикробным препаратам выполняли путём параллельного тестирования контрольных изолятов *E.coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью пакета программ MicroScan LabPro с операционной системой Windows 2000 Service pack 2, а также Microsoft Office Excel 2013 для Windows 8.1. Для анализа результатов исследования рассчитывали относительные экстенсивные показатели (проценты). Достоверность различий оценивали по критерию Хи-квадрат Пирсона (χ^2). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Этиологическая структура возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей у взрослых отличалась видовым разнообразием (табл. 2).

Среди 1459 уропатогенов преобладали представители семейства Enterobacteriaceae (77,0%), реже выделялись грамположительные бактерии (18,3%) и неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОВ) (4,2%). Удельный вес *Candida*

Таблица 1. Диагнозы направления образцов мочи

Диагнозы направления	Количество образцов мочи от мужчин, n (%)	Количество образцов мочи от женщин, n (%)
Пиелонефрит	20 (5,9)	70 (6,3)
Пиелонефрит хронический	55 (16,1)	140 (12,5)
Цистит	70 (20,5)	291 (26)
Цистит хронический	30 (8,8)	156 (14)
Мочекаменная болезнь	5 (1,5)	50 (4,5)
Инфекция мочевыводящих путей	116 (34,0)	386 (34,5)
Простатит	25 (7,3)	0
Другое	20 (5,9)	25 (2,2)
Всего	341 (100,0)	1118 (100,0)

Таблица 2. Структура возбудителей внебольничных ИМП, выделенных у взрослых в Колпинском районе Санкт-Петербурга в 2013–2015 гг.

Возбудители	2013 (n=397), %	2014 (n=632), %	2015 (n=430), %	За 3 года (n=1459), %
Семейство Enterobacteriaceae, в том числе:	79,1	76,4	75,8	77,0
<i>E.coli</i>	53,1	53,5	49,1	52,1
<i>K.pneumoniae</i>	8,8	9,0	13,2*	10,2
<i>Enterobacter</i> spp.	7,6	4,3	3,5*	5,0
<i>P.mirabilis</i>	3,8	3,6	2,8	3,4
Прочие	5,8	6,0	7,2	6,3
Грамположительные кокки, в том числе:	14,9	18,0	22,1**	18,3
<i>S.saprophyticus</i>	0,5	0,6	2,8*	1,2
<i>S.aureus</i>	1,3	0,6	1,2	1,0
Другие стафилококки	8,5	6,9	7,6	7,5
<i>E.faecalis</i>	2,3	5,0*	4,2	4,0
Прочие	2,3	4,9	6,3**	4,6
Неферментирующие грамотрицательные бактерии, в том числе:	5,5	5,1	1,6**	4,2
<i>P.aeruginosa</i>	0,5	0,8	0,7	0,7
<i>Acinetobacter</i> spp.	4,3	3,5	0,4**	2,8
Прочие	0,7	0,8	0,5	0,7
Микромицеты, в том числе:	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Candida</i> spp.	0,5	0,5	0,5	0,5
Всего:	100,0	100,0	100,0	100,0

Примечание. * Хи-квадрат Пирсона от 4,280 до 5,873 при критическом значении 3,841 — различия достоверны ($p < 0,05$); ** Хи-квадрат Пирсона от 6,654 до 11,752 при критическом значении 3,841 — различия достоверны ($p < 0,01$).

spp. в течение всего периода не превышал 0,5%. Доля энтеробактерий колебалась от 79,1 до 75,8%, однако указанные различия не являются статистически достоверными ($p > 0,05$). Отмечено снижение частоты выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВ) за указанный период с 5,5 до 1,6% ($\chi^2=8,223$, $p < 0,01$). Вместе с тем количество грамположительных бактерий увеличилось с 14,9 до 22,1% ($\chi^2=6,654$, $p < 0,01$).

Доминирующим возбудителем внебольничных ИМП являлась *E.coli*, доля которой в среднем за 3 года составила 52,1% и колебалась от 49,1 до 53,1% ($p > 0,05$). Частота выделения *K.pneumoniae* в общей структуре уропатогенов увеличилась с 9,0% в 2014 г. до 13,2% в 2015 г. ($\chi^2=4,362$, $p < 0,05$) с одновременным увеличением её доли среди энтеробактерий ($\chi^2=4,734$, $p < 0,05$). Одновременно отмечалось снижение доли *Enterobacter* spp. в общей структуре возбудителей с 7,6% в 2013 г. до 3,5% в 2015 г. ($\chi^2=5,873$, $p < 0,05$), а также среди энтеробактерий ($\chi^2=5,269$, $p < 0,05$). Частота обнаружения *P.mirabilis* колебалась от 2,8 до 3,8% ($p > 0,05$).

Выявленная тенденция к снижению удельного веса НГОВ в структуре внебольничных уропатогенов была связана преимущественно со снижением доли *Acinetobacter* spp. с 4,3% в 2013 г. до 0,4% в 2015 г. ($\chi^2=11,752$, $p < 0,01$).

Частота обнаружения грамположительных бактерий напротив характеризовалась тенденцией к росту. Среди значимых уропатогенов рода *Staphylococcus* в среднем за 3 года были идентифицированы: *S.saprophyticus* (1,2%) — удельный вес увеличился с 0,5 до 2,8% ($\chi^2=5,186$, $p < 0,05$) и *S.aureus* (1,0%), удельный вес которых колебался незначительно. Доля *E.faecalis* увеличилась с 2,3%

в 2013 г. до 5,0% в 2014 г. ($\chi^2=4,280$, $p < 0,05$), однако незначительно снизилась до 4,2% в 2015 г. Выявлено увеличение с 2,3% в 2013 г. до 6,3% в 2015 г. ($\chi^2=7,046$, $p < 0,01$) доли грамположительных кокковых микроорганизмов (*Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Rhodococcus equi*, *Gemella* spp.), роль которых в этиологии ИМП сомнительна.

Следует отметить, что, несмотря на статистически значимые изменения структуры внебольничных уропатогенов, основными возбудителями ИМП по-прежнему остаются бактерии семейства Enterobacteriaceae, при этом доминируют *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter* spp. и *P.mirabilis*. В то же время в 6,3% из мочи были выделены другие представители этого семейства (табл. 3), роль которых в этиологии ИМП не окончательно не определена.

E.vulneris (9 изолятов, 0,6%) — выделяется из внешней среды, питьевой воды, от животных и людей, может колонизировать различные биотопы, особенно раны; описаны случаи инвазивных инфекций, включая остеомиелиты, инфекции мягких тканей, бактериемии, уросепсис, септический шок и менингит [8].

E.fergusonii (2 изолята, 0,1%) — нечастый, но встречающийся патоген человека, выделяется из кишечника теплокровных животных и иногда людей; описаны случаи раневой и плевральной инфекций, диареи, бактериемии, ИМП [9]. По данным [10], на долю *E.fergusonii* приходится до 11,0% от общего числа возбудителей внебольничных ИМП. Большинство изолятов чувствительны к ингибиторозащищённым аминопенициллинам, цефалоспорином III–IV, карбапенемам,

Таблица 3. Редкие возбудители внебольничных ИМП у взрослых в Колпинском районе Санкт-Петербурга в 2013—2015 гг.

Возбудители	2013—2015, абс. (%)
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Citrobacter koseri</i>	25 (1,7%)
<i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	22 (1,5%)
<i>Escherichia fergusonii</i> , <i>Escherichia vulneris</i>	11 (0,7%)
<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus penneri</i>	10 (0,7%)
<i>Morganella morganii</i>	8 (0,6%)
<i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia fonticola</i>	7 (0,5%)
<i>Hafnia alvei</i>	4 (0,3%)
<i>Yokenella regensburgei</i>	2 (0,1%)
<i>Providencia rustigianii</i> , <i>Providencia stuartii</i>	2 (0,1%)
<i>Cedecea lapagei</i>	1 (0,1%)
Всего:	92 (6,3%)

амикацину и нитрофурантоину, однако обладают устойчивостью к ампициллину, пиперациллину и гентамицину чаще, чем изоляты *E.coli*, выделенные при внебольничных ИМП [9, 10].

H.alvei (4 изолята, 0,3%) — также является нечастым патогеном человека, иногда выделяется из кишечника человека; описаны случаи холангитов и холециститов, аппендицитов, гнойных абсцессов, эндокардита после протезирования сердечного клапана, респираторных инфекций, а также ИМП. Высокую эффективность против изолятов *H.alvei* сохраняют аминогликозиды, фторхинолоны, имипенем и цефепим. Многие изоляты устойчивы к цефалоспорином I—III поколений, налидиксовой кислоте, триметоприму, хлорамфениколу [11, 12].

Y.regensburgei (2 изолята, 0,1%) — это оппортунистический патоген человека, фенотипически сходный с *H.alvei*; иногда выделяется из кишечника человека; описаны случаи бактериемии, септицемии, связанной с поражением кожи и мягких тканей, инфекций ран и дыхательных путей, ИМП [13]. Большинство изолятов чувствительны к аминогликозидам, хлорамфениколу, фосфомицину, нитрофурантоину, хинолонам и тетрациклином, но проявляют устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином I—III поколений, макролидам, линкозамидам, фузидиновой кислоте и гликопептидам [13, 14].

C.lapagei (1 изолят, 0,1%) — это один из 6 видов рода *Cedecea*. В литературе представлены лишь единичные случаи инфекции ран, перитонита, бактериемии, пневмонии, вызванные *C.lapagei* у пациентов с иммуносупрессией и/или на фоне тяжелой сопутствующей патологии. Описан случай выделения *C.lapagei* при ИМП у пациента с травмой позвоночника; изолят обладал чувствительностью к ципрофлоксацину (полные данные о спектре антибиотикорезистентности в статье не представлены) [15]. Другой возбудитель рода *Cedecea* — *C.davisae*, выделенный из мочи, был нечувствительным к цефалоспорином III поколения и карбапенемам [16].

Providencia spp. (2 изолята, 0,1%) — выделяется при ИМП у детей и подростков с частотой

2,0—2,1%, у взрослых в зависимости от возраста — с частотой 1,7—1,9%. По результатам 10-летнего мониторинга этиологии ИМП и уровня антибиотикорезистентности возбудителей, от 87,3 до 99,0% изолятов *Providencia* spp. устойчивы к аминогликозидам, цефалоспорином I поколения, нитрофурантоину, амоксициллину, что превышает уровень резистентности изолятов *E.coli* — наиболее частого возбудителя ИМП. Активность в отношении *Providencia* spp. сохраняют цефалоспорины III—IV поколений и амикацин. В целом, бактерии рода *Providencia*, так же как и *P.vulgaris*, являются наиболее частыми множественнорезистентными (MDR) уропатогенами [17].

Принимая во внимание, что обнаружение значительной части видов грамотрицательных бактерий имеет диагностическую ценность при ИМП, ниже представлены результаты определения антибиотикорезистентности данных возбудителей (табл. 4). Грамотрицательные уропатогены сгруппированы в зависимости от уровня природной устойчивости к АМП в соответствии с правилами EUCAST [18].

Как видно из представленных данных, отмечается высокая частота обнаружения изолятов энтеробактерий, нечувствительных к ампициллину/сульбактаму (от 38,0 до 100,0%), азтреонаму (от 32,5 до 97,5%) и цефалоспорином III—IV поколений (от 17,5 до 97,5%), продукция БЛРС выявлена у 20,3% изолятов энтеробактерий. Наибольшую активность в отношении данных возбудителей сохранили карбапенемы (0,3—14,0% нечувствительных изолятов).

Следует отметить, что частота выделения нечувствительных изолятов энтеробактерий варьировала в различных группах природной устойчивости. Наименьшее число нечувствительных изолятов выявлено среди *E.coli*: к ампициллину — до 45,7%, ингибиторозащищенным пенициллинам — 14,2—39,7%, азтреонаму — 32,5%, фторхинолонам — до 21,7%, цефалоспорином III—IV поколений — 17,5—8,7%, аминогликозидам — до 10,7%. Наряду с карбапенемами, высокую активность в отношении *E.coli* сохранил нитрофурантоин, к которому оказались нечувствительными

Таблица 4. Частота обнаружения нечувствительных к антимикробным препаратам изолятов (%) среди основных грамотрицательных возбудителей ИМП у взрослых в Колпинском районе Санкт-Петербурга в 2013–2015 гг.

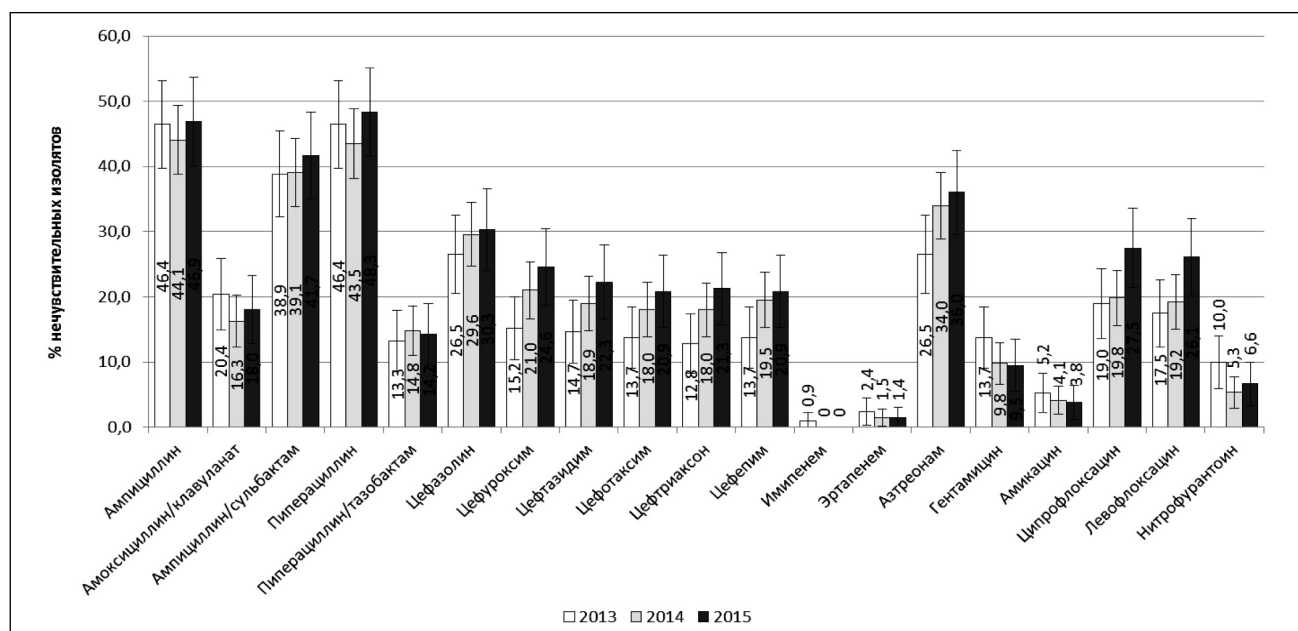
Антибиотики	Группы природной устойчивости							
	группа 1	группа 2	группа 3	группа 4	группа 5			
	<i>E.coli</i> (n=760)	<i>P.mirabilis</i> (n=50)	<i>Klebsiella</i> <i>spp.</i> (n=171)	<i>C.amalonicus</i> , <i>Enterobacter</i> <i>C.koseri</i> , <i>E.fergusonii</i> , <i>E.vulneris</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>P.penneri</i> (n=24)	<i>C.freundii</i> , <i>Morganella</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Cedecea</i> spp., <i>Providencia</i> spp. (n=40)	<i>P.aeruginosa</i> (n=10)	<i>Acinetobacter</i> <i>spp.</i> (n=41)	
Пенициллины								
Ампициллин	45,5	66,0	95,9	75,0	91,7	100,0	—	—
Амоксицилин/ клавуланат	17,9	16,0	36,8	16,7	86,1	97,5	—	—
Ампициллин/ сульбактам	39,7	38,0	50,3	58,3	90,3	100,0	—	46,3
Пиперациллин/ тазобактам	14,2	12,0	31,0	16,7	81,9	97,5	100,0	—
Цефалоспорины								
Цефазолин	28,9	50,0	50,9	62,5	91,7	97,5	—	—
Цефуоксим	20,4	42,0	43,9	45,8	84,7	97,5	—	—
Цефтазидим	18,7	60,0	37,4	33,3	86,1	100,0	100,0	31,7
Цефотаксим	17,6	40,0	36,8	41,7	86,1	97,5	—	53,7
Цефтриаксон	17,5	36,0	37,4	45,8	86,1	97,5	—	58,5
Цефепим	18,3	46,0	38,0	33,3	41,7	47,5	50,0	36,6
Карбапенемы								
Имипенем	0,3	14,0	1,2	12,5	2,8	7,5	10,0	—
Эртапенем	1,7	12,0	5,3	12,5	13,9	10,0	—	—
Монобактамы								
Азтреонам	32,5	90,0	43,9	58,3	88,9	97,5	100,0	—
Аминогликозиды								
Гентамицин	10,8	18,0	31,0	12,5	26,4	17,5	10,0	26,8
Амикацин	4,3	10,0	19,9	8,3	20,8	15,0	10,0	26,8
Фторхинолоны								
Ципрофлоксацин	21,7	22,0	48,5	8,3	27,8	22,5	10,0	39,0
Левифлоксацин	20,7	2,0	45,0	8,3	23,6	17,5	10,0	31,7
Другие								
Нитрофурантоин	7,0	100,0	72,5	45,8	68,1	52,5	—	—

лишь 7,0% изолятов. Наибольшее число нечувствительных к АМП изолятов выявлено среди энтеробактерий, обобщённых в группу 3 (*C.freundii*, *Morganella* spp., *Serratia* spp., *Cedecea* spp., *Providencia* spp.), которые характеризуются природной устойчивостью к большинству пенициллинов, включая ингибиторозащищённые, цефалоспоринов, нитрофурантоину. Максимальную устойчивость проявил изолят *C.lapagei*, который был нечувствительным ко всем протестированным АМП. Несмотря на то, что частота обнаружения указанной группы энтеробактерий среди всех уропатогенов составляет 2,7%, экстремальный уровень резистентности, наряду с недостаточной информированностью врачей об этиологической роли указанных возбудителей снижают эффективность терапии вызванных ими инфекций. Среди неферментирующих грамотрицательных бактерий наибольшей устойчивостью к АМП обладали изоляты *P.aeruginosa*, в отношении которых высокой активностью обладали карбапенемы, аминогликозиды и фторхинолоны (10,0% нечувствительных изолятов).

Как отмечалось ранее, наиболее распространённым возбудителем внебольничных ИМП яв-

ляется *E.coli* (52,1% среди уропатогенов за три года), в отношении которого особый интерес представляет динамический мониторинг уровня популяционной резистентности (см. рисунок).

Как видно из представленных данных, в течение 2013–2015 гг. частота выделения изолятов *E.coli*, нечувствительных к пенициллинам, монобактамам, карбапенемам, аминогликозидам и нитрофурантоину, колебалась без статистически значимых изменений. Вместе с тем следует отметить, что в отношении цефалоспоринов и фторхинолонов в течение трёх лет наблюдалась тенденция к нарастанию числа нечувствительных изолятов. Относительно непродолжительный период наблюдения, а также ограниченный объём выборки не позволяют нам сделать достоверный вывод о сдвигах в уровне популяционной резистентности *E.coli*. В то же время очевидно, что использование для формирования локальных схем эмпирической терапии усреднённых данных многоцентровых исследований может приводить к значительным ошибкам. Так, локальный уровень устойчивости к цефалоспорином III–IV поколений в настоящем исследовании оказался существенно выше, чем в исследовании ДАРМИС выполненном в



Чувствительность к антимикробным препаратам изолятов *E.coli*, выделенных при ИМП у взрослых в Колпинском районе Санкт-Петербурга в 2013–2015 гг.

Таблица 5. Частота обнаружения нечувствительных к антимикробным препаратам изолятов (%) среди основных грамположительных возбудителей ИМП у взрослых в Колпинском районе Санкт-Петербурга в 2013–2015 гг.

Антибиотики	Бактерии				
	<i>S.aureus</i> (n=14)	<i>S.saprophyticus</i> (n=18)	другие коагулазоотрицательные стафилококки* (n=102)	<i>E.faecalis</i> (n=59)	<i>S.agalactiae</i> (n=18)
Пенициллины					
Пенициллин	78,6	88,9	79,4	18,6	0,0
Оксациллин	42,9	66,7	46,1	—	—
Аминогликозиды					
Гентамицин	71,4	22,2	36,3	—	—
Фторхинолоны					
Ципрофлоксацин	50,0	5,6	32,4	—	—
Левофлоксацин	—	—	—	37,3	11,1
Гликопептиды					
Ванкомицин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Другие					
Тетрациклин	57,1	22,2	42,2	88,1	100,0
Рифампицин	21,4	16,7	16,7	61,0	—
Линезолид	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Нитрофурантоин	14,3	0,0	9,8	11,9	0,0

Примечание. * — другие коагулазоотрицательные стафилококки представлены видами, преимущественно выделяемыми от людей: *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*.

2010–2011 гг. [19]: 20,9–22,3% против 5,5–8,8% ($\chi^2=14,923$ –28,434, $\chi^2_{\text{крит.}}=3,841$, $p<0,01$).

Несмотря на превалирование грамотрицательных микроорганизмов среди внебольничных уропатогенов, по нашим данным, 18,3% изолятов представлены грамположительными микроорганизмами, среди которых наибольшее этиологическое значение признано за *S.saprophyticus* и *S.aureus*. Прочие грамположительные бактерии считаются сомнительными уропатогенами, однако, являясь представителями нормобиоты тела человека, могут играть роль потенциального ре-

зервуара и вектора передачи генов резистентности. На основании вышеизложенного, представляется целесообразным оценить частоту выделения нечувствительных изолятов основных групп грамположительных бактерий (табл. 5).

Значительная часть изолятов стафилококков оказались нечувствительными к оксацилину, результаты оценки чувствительности к которому были экстраполированы на все бета-лактамы антибиотиков. Наибольшее количество метициллино-резистентных изолятов выявлено среди *S.saprophyticus* — 66,7%. Вместе с тем, следует отметить,

что удельный вес изолятов *S.saprophyticus*, нечувствительных к остальным протестированным АМП был ниже, чем у других видов стафилококков: к гентамицину и тетрациклину — по 22,2%, рифампицину — 16,7%, ципрофлоксацину — 5,6%. Среди *S.aureus* выявлена высокая частота нечувствительных изолятов к гентамицину — 71,4%, тетрациклину — 57,1%, ципрофлоксацину — 50,0% и рифампицину — 21,4%. Нечувствительными к нитрофурантоину оказались 14,3% изолятов *S.aureus* и 9,8% изолятов КОС, исключая изоляты *S.saprophyticus*, 100,0% которых обладали чувствительностью к данному препарату. Среди стафилококков не выявлено изолятов устойчивых к ванкомицину и линезолиду. Все изоляты *E.faecalis* также были чувствительны к ванкомицину и линезолиду. Высокой эффективностью в отношении *E.faecalis* обладали пенициллин и нитрофурантоин — 18,6 и 11,9% нечувствительных изолятов, соответственно. Удельный вес изолятов, нечувствительных к левофлоксацину, рифампицину и тетрациклину, составил 33,7, 61,0 и 88,1%, соответственно.

Следует отметить, что согласно рекомендациям ЕАУ по лечению ИМП [1], при несложнённом цистите препаратами выбора являются фосфомицин и нитрофурантоин. Доля нечувствительных к нитрофурантоину изолятов выявленных нами уропатогенов колебалась от 0 до 100,0%, что в значительной мере снижает эффективность эмпирической терапии. Кроме того, при выборе данного препарата следует учитывать низкую чувствительность к нему энтерококков, а также природную устойчивость *P.aeruginosa*, *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. и *Acinetobacter* spp., которые также были выявлены нами среди уропатогенов, несмотря на превалирование изолятов *E.coli*. В отношении фторхинолонов уровень резистентности также варьировал и достигал 48,0—50,0% у изолятов *Klebsiella* spp. и *S.aureus*, что также существенно снижает прогностическую эффективность эмпирической терапии инфекций нижнего и верхнего отделов мочевыделительной системы, для которых фторхинолоны являются альтернативными препаратами и препаратами выбора, соответственно. При осложнённых ИМП, наряду с фторхинолонами, препаратами выбора являются ингибиторозащищённые пенициллины, цефалоспорины II—III поколений и аминогликозиды. Частота обнаружения изолятов уропатогенов, нечувствительных к данным препаратам, превышала 20,0% для всех изолятов за исключением некоторых видов энтеробактерий, которые обладали высокой чувствительностью (95,7—80,1%) к аминогликозидам. Принимая во внимание невысокие показатели чувствительности к АМП и вариативность спектров резистентности у разных видов уропатогенов, следует признать, что широко распространённое мнение о превалировании *E.coli* в этиологической структуре

ИМП и практика назначения эмпирической терапии могут отрицательным образом сказываться на эффективности терапии данной группы инфекций, в том числе вследствие невозможности полной и быстрой элиминации возбудителей. В 1999 г. в рекомендациях Общества по инфекционным болезням Америки (Infectious Diseases Society of America — IDSA) [20], было предложено избегать эмпирического назначения ко-тримоксазола, если устойчивость к нему в регионе превышает 20%. В современных европейских рекомендациях целесообразность применения этого критерия к другим антибиотикам подвергается сомнению [1]. Отсутствие общепринятых критериев для оценки возможности использовать тот или иной антибактериальный препарат в качестве средства эмпирической терапии затрудняет использование полученных в ходе настоящего исследования результатов.

Необходимо также остановиться на некоторых слабых сторонах настоящего исследования, к которым, в первую очередь, относится недостаток информации о диагнозах пациентов. Прежде всего, очевидно, что диагноз направления и окончательный диагноз могут не совпадать. Так в 34% случаев диагнозом направления был: «Инфекция мочевыводящих путей», ещё приблизительно в 20% случаев диагнозом направления были «Хронический цистит» и «Хронический пиелонефрит». Хотя с эпидемиологической точки зрения перечисленные инфекции можно отнести к внебольничным, поскольку все пациенты проходили лечение в амбулаторных условиях, полностью исключить связь с оказанием медицинской помощи вероятно нельзя, что может быть одной из причин достаточно высокой частоты продукции БЛРС.

Тем не менее, полученные данные имеют важное практическое значение поскольку отражают реальный уровень распространения антибиотикорезистентности среди уропатогенов, с которым приходится сталкиваться врачу амбулаторного звена.

Заключение

Таким образом, в 2013—2015 гг. в Колпинском районе Санкт-Петербурга в структуре возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей у взрослых преобладали энтеробактерии (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*, *Enterobacter* spp.), отмечена тенденция к снижению доли неферментирующих грамотрицательных бактерий и увеличению доли грамположительных бактерий. Частота обнаружения изолятов уропатогенов, нечувствительных к АМП, варьировала среди различных видов возбудителей, в значительной мере снижая прогностическую ценность эффективности эмпирической терапии, основанной на выборе препаратов для доминирующих групп возбудителей инфекций мочевыводящих путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grabe M., Bartoletti R., Bjerklund Johansen T.E., Cai T., Çek M., Köves B., Naber K.G., Pickard R.S., Tenke P., Wagenlehner F., Wullt B. European Association of Urology. Guidelines on urological infections 2015. [Accessed February 1 2017]. Available at: http://uroweb.org/wp-content/uploads/19-Urological-infections_LR2.pdf.
2. Tandoğlu Z., Wagenlehner F.M. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29: 73–79.
3. Gupta K., Hooton T.M., Wobbe C.L., Stamm W.E. The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11: 305–308.
4. Kahlmeter G. The ECO*SENS Project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens-interim report. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: Suppl A: 15–22.
5. Сидоренко С.В., Иванов Д.В. Результаты изучения распространения антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей в Москве. Фаза I. Антибиотики и химиотер. — 2005. — № 50. — С.3–10. / Sidorenko S.V., Ivanov D.V. Rezultaty izucheniya rasprostraneniya antibiotikorezistentnosti возбуdivitelej vnebol'nicnykh infekcij mochevvyvodyashchikh putej v Moskve. Faza I. Antibiotiki i khimioter 2005; 50: 3–10. [in Russian]
6. Рафальский В.В., Стречунский Л.С., Кречикова О.И., Эйдельштейн И.А., Ахметова Л.И., Бабкин П.А., Гугуцидзе Е.Н., Ильина В.Н., Коган М.И., Копылов В.В. и соавт. Резистентность возбудителей амбулаторных инфекций мочевыводящих путей по данным многоцентровых микробиологических исследований UTIAP-I и UTIAP-II. Урология. — 2004. — № 2. — С.13–17. / Rafal'skij V.V., Strachunskij L.S., Krechikova O.I., EHjdel'shtejn I.A., Akhmetova L.I., Babkin P.A., Gugucidze E.N., Il'ina V.N., Kogan M.I., Kopylov V.V. et al. Rezistentnost' возбуdivitelej ambulatornykh infekcij mochevvyvodyashchij putej po dannym mnogocentrovnykh mikrobiologicheskikh issledovanij UTIAP-I i UTIAP-II. Urologiya 2004; 2: 13–17. [in Russian]
7. CLSI. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2014; 2014.
8. Kilani B., Ammari L., Benaissa H.T., Ben Chaabane T., Fendri C. *Escherichia vulneris* as a cause of bacteremia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 110–111.
9. Savini V., Catavittello C., Talia M., Manna A., Pompetti F., Favaro M., Fontana C., Febbo F., Balbinot A., Di Berardino F. et al. Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1551–1552.
10. Bours P.H., Polak R., Hoepelman A.I., Delgado E., Jarquin A., Matute A.J. Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e770–774.
11. Ramos A., Dámaso D. Extraintestinal Infection due to *Hafnia alvei*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 708–710.
12. Lancelovee J., Bret L., David K., Di Martino P. Antibiotic resistance and adherence properties of *Hafnia alvei* clinical isolates: a 19-month study in the hospital of Orleans, France. *J Chemother* 2007; 19: 677–681.
13. Bhowmick T., Weinstein M.P. A deceptive case of cellulitis caused by a Gram-negative pathogen. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1320–1323.
14. Stock I., Sherwood K.J., Wiedemann B. Antimicrobial susceptibility patterns, beta-lactamases, and biochemical identification of *Yokenella regensburgi* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 5–15.
15. Cekin Y., Kizilates F., Dolu S., Oztoprak N. The first urinary tract infection caused by *Cedecea lapagei*: a case report and review of the literature. *Gaziantep Med J* 2014; 20: 193–195.
16. Ammenouche N., Dupont H., Mammeri H. Characterization of a novel *AmpC* beta-lactamase produced by a carbapenem-resistant *Cedecea davisae* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 6942–6945.
17. Linhares I., Raposo T., Rodrigues A., Almeida A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000–2009). *BMC Infect Dis* 2013; 13: 19.
18. EUCAST intrinsic resistance and exceptional phenotypes, Expert Rules version 3.1 26 September 2016 (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rules_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf).
19. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Шевелев А.Н., Гринев А.В., Перепанова Т.С. Современное состояние антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей в России: Результаты исследования «ДАРМИС» (2010–2011). Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2012. — № 14. — С.280–302. / Palagin I.S., Sukhorukova M.V., Dekhnych A.V., EHjdel'shtejn M.V., SHevelev A.N., Grinev A.V., Perepanova T.S. Sovremennoe sostoyanie antibiotikorezistentnosti возбуdivitelej vnebol'nicnykh infekcij mochevvyvodyashchikh putej v Rossii: Rezultaty issledovaniya «DARMIS» (2010–2011). Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2012; 14: 280–302. [in Russian]
20. Warren J.W., Abrutyn E., Hebel J.R., Johnson J.R., Schaeffer A.J., Stamm W.E. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis* 1999; 29: 745–758.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Каменева Ольга Анатольевна — заведующая централизованной специализированной бактериологической лабораторией Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Детская городская больница № 22», Санкт-Петербург

Морозова Светлана Евгеньевна — врач-бактериолог централизованной специализированной бактериологической лаборатории Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Детская городская больница № 22», Санкт-Петербург

Пунченко Ольга Евгеньевна — к. м. н., доцент 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

Косякова Карина Георгиевна — к. м. н., доцент кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного

бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; врач-бактериолог централизованной специализированной бактериологической лаборатории Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Детская городская больница № 22», Санкт-Петербург

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

Микробиологический мониторинг гнойных осложнений у ожоговых больных и молекулярно-генетические особенности метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA)

О. Е. ХОХЛОВА^{1,2}, О. В. ПЕРЬЯНОВА^{1,2}, И. В. ВЛАДИМИРОВ³, В. А. МАЦКЕВИЧ³, Н. К. ПОТКИНА², Д. Н. КАПШУК¹, Л. Н. КОПЫТКО³, В. В. ГОСТЕВ⁴, С. В. СИДОРЕНКО⁴, Я. ИВАО⁵, Т. ЯМАМОТО^{2,5}

¹ Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, Красноярск

² Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, Красноярск

³ Краевая клиническая больница, Красноярск

⁴ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

⁵ Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC) Ниигата, Япония

Microbiological Monitoring of Purulent Complications in Burn Patients and Molecular Genetic Features of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA)

О. Е. KHOKHLOVA^{1,2}, О. В. PERYANOVA^{1,2}, I. V. VLADIMIROV³, V. A. MATSKEVICH³, N. K. POTKINA², D. N. KAPSHUK¹, L. N. KOPYTKO³, V. V. GOSTEV⁴, S. V. SIDORENKO⁴, YA. IWAO⁵, T. YAMAMOTO^{2,5}

¹ Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F.Voino-Yasenetski, Krasnoyarsk

² Russia-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk

³ Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk

⁴ Children's Scientific and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg

⁵ International Medical Educational Research Center (IMERC) Niigata, Japan

Цель исследования — изучение микрофлоры гнойных осложнений, её антибиотикорезистентности и молекулярно-генетических особенностей MRSA у ожоговых больных. **Материал и методы.** Исследована микрофлора биоптатов, раневого отделяемого у 145 пациентов с термическими ожогами в первые сутки и на 10—50-е сутки пребывания в краевом ожоговом центре ККБ в 2013—2016 гг. Изучены молекулярно-генетические особенности 12 штаммов MRSA, изолированных от разных ожоговых больных. **Использованные методы** — бактериологический, ПЦР, М-ПЦР, секвенирование, PFGE, реакция агглютинации. **Результаты.** В первые сутки госпитализации при посеве биоптата, раневого отделяемого ожоговых больных рост микроорганизмов выявлен в 25,5% случаев, доминировали грамположительные микроорганизмы, в частности MSSA (37,8%). На 10—50-е сутки госпитализации рост получен в 93,2% случаев, доминировала грамотрицательная микрофлора (53,4%), при этом значительную роль играют *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. (38,0%), характеризующиеся высокой степенью резистентности к антимикробным препаратам: доля XDR — 18%, доля PDR — 67%. На 10—50-е сутки госпитализации также значительную роль играют стафилококки (38,7%), при этом доля MRSA — 62,2%. Установлена циркуляция одного клона MRSA у ожоговых больных — ST239/*spa3*(t037)/*agr1*/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/CoaIV, характеризующегося множественной резистентностью к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: ожоговые больные, микрофлора гнойных осложнений, антибиотикорезистентность, метициллинорезистентные *Staphylococcus aureus*, генотипирование.

The aim of the study was to research the microflora of suppurative complications, its antibiotic resistance, and the molecular genetic features of MRSA in burn patients. **Material and methods.** The microflora of biopsy specimens, wound fluid from 145 patients with thermal burns was investigated on the first day and on the 10—50th days of stay in the burn center of the Regional Clinical Hospital in 2013—2016. The molecular genetic features of 12 strains of MRSA isolated from different burn patients have been studied. **Methods used:** bacteriological, PCR, M-PCR, sequencing, PFGE, agglutination reaction. **Results.** On the first day of hospitalization, when biopsy specimen and wound fluid were taken, microbial growth was detected in 25.5% of cases, gram-positive microorganisms, in particular MSSA (37.8%), dominated. On the 10—50th days of hospitalization, growth was obtained in 93.2% of cases, Gram-negative microflora (53.4%) dominated, with a significant role played by *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. (38.0%), characterized by a high degree of resistance to antimicrobial drugs: XDR — 18%, PDR — 67%. On the 10—50th days of hospitalization, a significant role was played by staphylococci (38.7%), while the proportion of MRSA was 62.2%. Circulation of one MRSA clone in burn patients — ST239/*spa3*(t037)/*agr1*/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/CoaIV, characterized by multiple resistance to antimicrobial agents, was established.

Keywords: burn patients, microflora of purulent complications, antibiotic resistance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, genotyping.

Инфекционные осложнения у ожоговых больных по-прежнему являются актуальной медицинской и социальной проблемой [1]. Утрата защитного барьера кожи и иммуносупрессия, связанные с ожоговой травмой, приводят к развитию гнойно-воспалительных осложнений. По сравнению с другими группами пациентов, нуждающихся в интенсивной терапии, у пациентов с ожогами показатели инфекционных осложнений одни из самых высоких [2–6].

В Национальном отчёте по ожоговым больным США (NBR) приводятся данные о трёх главных осложнениях у пациентов с ожогами, таких как пневмония, флегмона и инфекции мочевыводящих путей [7]. При этом, наиболее частыми осложнениями у ожоговых пациентов, не находящихся на искусственной вентиляции лёгких, являются локальные воспалительные осложнения такие как гнойное расплавление аутодерматрансплантатов, нагноение области донорского забора, флебиты, флегмона, а так же постинъекционные абсцессы [7, 8]. По результатам исследований установлено, что на долю инфекционных осложнений приходится 30–75% всех смертельных исходов [9, 10]. У пациентов с ожоговыми ранами в 8,5–11 раз повышается риск смертности в случае, если инфекционные осложнения вызваны микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [11].

В США в последние годы одними из лидирующих возбудителей инфекционных осложнений у ожоговых больных являются метициллиночувствительные *Staphylococcus aureus* (MSSA) (19,6% от всех обследованных), *Enterococcus faecalis* (12,5%), метициллинорезистентные *S.aureus* (MRSA) (11,0%) и *Pseudomonas aeruginosa* (10,7%) [12]. В России ведущими возбудителями инфекционных осложнений у ожоговых пациентов также являются *S.aureus* (35,7%), при этом доля MRSA составляет до 82% и *P.aeruginosa* (33,3%) [13–16].

Изучение молекулярно-генетических особенностей штаммов MRSA, изолированных от ожоговых больных г. Красноярск, ранее не проводилось.

Для проведения адекватной эмпирической антибиотикотерапии и прогноза резистентности важно регулярно вести мониторинг микрофлоры и изучать её молекулярно-генетические особенности как на уровне страны, региона, так и на локальном уровне.

Цель исследования — изучение микрофлоры гнойных осложнений, её антибиотикорезистентности и молекулярно-генетических особенностей MRSA у ожоговых больных.

Материал и методы

Обследованы 145 пациентов с термическими ожогами IIIA, IIIB и IV степенью, поступившие в отделение анестезиологии-реанимации №4 краевого ожогового центра ККБ в 2013–2016 гг. Возраст пациентов — 14–64 лет, из них 112

мужчин (70%) и 33 женщины (30%). Забор материала от ожоговых больных производился в первые 48 ч пребывания в стационаре и далее по мере необходимости. Материалами для исследования служили биоптат, раневое отделяемое.

Посев биоптата, раневого отделяемого производили по методу Gould для оценки этиологической роли выделенных микроорганизмов на комплекс питательных сред — кровяной агар, желточно-солевой агар, хром-агар. Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфо-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств, используя помимо рутинных методов тест-системы Remel (США) для идентификации микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона с использованием дисков OXOID (Великобритания); чувствительность стафилококков к оксациллину и другим антимикробным препаратам (Sigma-Aldrich, США) проводили методом скрининга и методом серийных разведений в агаре Мюллера–Хинтона в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Для внутрилабораторного контроля определения антибиотикочувствительности и метициллинорезистентности использовали референс-штаммы из коллекции ATCC. Продукцию БЛРС у энтеробактерий определяли фенотипическим методом «двойных дисков» на среде Мюллера–Хинтона с использованием дисков OXOID и дисков компании MAST, содержащих ингибиторы БЛРС и AmpC. Продукцию МБЛ проводили методом инактивации карбапенемов (CIM).

Анализ микрофлоры и антибиотикочувствительности осуществляли с помощью программы WHONET v.5.6. Нулевую гипотезу об отсутствии различий между набором возбудителей в разные сутки пребывания в стационаре проверяли с использованием критерия χ^2 .

Тотальную ДНК штаммов *S.aureus* получали термическим методом 99°C 15 мин. Подтверждение принадлежности к MRSA проводили с помощью ПЦР (гены *nuc*, *mecA*). Для генетических исследований MRSA микроорганизмы культивировали в бульоне LB (Difco, Detroit, MI) при температуре 37°C до фазы логарифмического роста. Отжиг праймеров проводили при 55°C в течение 60 с. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием бромистого этидия. В качестве контроля молекулярной массы использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich, Япония) и KAPA Universal DNA ladder (KAPA, США).

С помощью ПЦР определяли 47 генов патогенности: 3 лейкоцидина; 4 гемолизина; 2 белковых цитоллизина (*psm α* , *hld*); 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE): *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*; 3 эксфолиатина; *set*, *edin*, *ssl*; 14 генов адгезии; *ACME-arcA* и *-opp-3C* [17].

Молекулярное типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [17]. MLST типирование основано на изучении семи «генов домашнего хозяйства» и определения аллельного профиля (аллельный номер) с использованием вебсайта (<http://www.mlst.net/>). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST. Spa типирование проводили с помощью секвенирования с последующим анализом с использованием базы данных eGenomics (<http://tools.egenomics.com/>) или Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>). SCCmec типирование (I–V типы) — с применением ПЦР, М-ПЦР. Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями [18, 19] (<http://www.staphylococcus.net/>). Детекцию регуляторного гена (*agr*) и определение принадлежности к аллельной группе проводили с применением ПЦР. Коагулазотипирование (Coa) проводили с использованием наборов, включающих различные стафилококковые антикоагулязные сыворотки (Denka Seiken, Tokyo, Japan) или путём анализа результатов секвенирования гена *coa*. В качестве контроля использовали референтные штаммы.

Таблица 1. Микрофлора гнойных осложнений у ожоговых больных, 2013–2016 гг.

Микроорганизмы	Количество (%)					
	1-е сутки n=145	10-е сутки n=106	20-е сутки n=45	30-е сутки n=24	40-е сутки n=13	50-е сутки n=4
Моноинфекция	32 (69,6)	62 (63,3)	30 (71,4)	13 (56,5)	6 (54,5)	1 (25)
Микст-инфекция	14 (30,4)	36 (36,7)	12 (28,6)	10 (43,5)	5 (45,5)	3 (75)
Enterobacteriaceae	4 (5,3)	23 (14,1)	9 (16,1)	4 (10,3)	3 (13)	6 (50)
<i>E.coli</i>	0	6 (3,7)	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (2,7)	2 (1,2)	1 (1,8)	1 (2,6)	0	1 (8,3)
<i>Proteus</i> spp.	1 (1,3)	7 (4,3)	3 (5,4)	0	2 (8,7)	3 (25)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (1,3)	8 (4,9)	5 (8,9)	3 (7,7)	1 (4,3)	2 (16,7)
НГОБ	19 (25,7)	61 (37,6)	21 (37,5)	14 (35,8)	12 (52,2)	3 (25)
<i>Pseudomonas</i> spp.	11 (14,9)	29 (17,9)	17 (30,4)	9 (23,1)	9 (39,2)	2 (16,7)
<i>Acinetobacter</i> spp.	8 (10,8)	32 (19,7)	4 (7,1)	5 (12,7)	3 (13,0)	1 (8,3)
Грамположительные	43 (69)	76 (47,1)	26 (46,4)	20 (51,3)	8 (34,8)	2 (16,7)
<i>Enterococcus</i> spp.	2 (2,7)	9 (5,6)	1 (1,8)	0	3 (13,0)	1 (8,4)
<i>Streptococcus</i> spp.	1 (1,3)	1 (0,6)	0	1 (2,6)	0	0
<i>S.aureus</i> MSSA	28 (37,8)	28 (17,3)	6 (10,6)	3 (7,7)	0	0
<i>S.aureus</i> MRSA	7 (9,6)	27 (16,8)	17 (30,4)	12 (30,7)	4 (17,5)	1 (8,3)
<i>S.epidermidis</i> MSSE	5 (6,8)	6 (3,7)	1 (1,8)	1 (2,6)	1 (4,3)	0
<i>S.epidermidis</i> MRSE	0	4 (2,5)	0	2 (5,1)	0	0
<i>Corynebacterium</i> spp.	8 (10,8)	1 (0,6)	1 (1,8)	1 (2,6)	0	0
Грибы	0	2 (1,2)	0	1 (2,6)	0	1 (8,3)
<i>Candida</i> spp.	0	2 (1,2)	0	1 (2,6)	0	1 (8,3)
Всего	74 (100)	162 (100)	56 (100)	39 (100)	23 (100)	12 (100)

Примечание. n – число обследованных; НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии.

Бактериальную ДНК для гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) расщепляли с помощью SmaI с последующим электрофорезом в 1,2% агарозном геле с применением маркерной ДНК (Lambda ladder; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, США), как было представлено ранее [20]. Плазмидный профиль штаммов MRSA был изучен с помощью модифицированного метода, предложенного [21] с применением лизостафина и Plasmid Midi Kit (QIAGEN Sciences, Токио). Данные о частоте встречаемости MRSA различных генетических вариантов были анализированы с помощью теста Фишера. Уровень значимости – $p < 0,05$.

Исследования одобрены Этическим Комитетом при КрасГМУ, №28/2010.

Результаты исследования

У ожоговых больных при посеве биоптатов, раневого отделяемого в первые сутки исследования рост был получен в 25,5% случаев в этиологически значимом количестве. Доля ассоциаций микроорганизмов в биоптате, раневом отделяемом составила 30,4% (табл. 1). При исследовании биоптата, раневого отделяемого у ожоговых больных в первые сутки в составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 69% случаев и представленные преимущественно *Staphylococcus* spp, а также *Enterococcus* spp. и *Corynebacterium* spp. (табл. 1). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) приходилось 25,7% случаев, при этом среди них доминировали *P.aeruginosa*. Среди представителей семейства Enterobacteriaceae (5,3%) доминировали *Enterobacter* spp. Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены не были. Наиболее частыми ассоциантами в первые сутки госпитализации являются MSSA и *P.aeruginosa* (21,4%); MSSA и метициллиночувствительные *Staphylococcus epidermidis*

(28,6%); MRSA и *Corynebacterium* spp. (21,4%); *P.aeruginosa* и *Proteus vulgaris* (14,3%).

На 10–50-е сутки пребывания в стационаре ожоговых больных при посеве биоптатов, раневого отделяемого рост был получен в 92,7% случаев. Доля ассоциаций микроорганизмов составила 62,9% (см. табл. 1). В составе микрофлоры преобладали грамотрицательные микроорганизмы, выделенные в 53,4% случаев. На долю НГОБ приходилось 38,0%, при этом среди них доминировали *P.aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Среди представителей семейства Enterobacteriaceae (15,4%) доминировали *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus* spp. Грамположительные микроорганизмы выделены в 45,2% случаев и представлены преимущественно *Staphylococcus* spp. (38,7%), а также *Enterococcus* spp. (4,8%) (см. табл. 1). Дрожжеподобные грибы р. *Candida* выделены в 1,0% случаев.

Наиболее частыми ассоциантами гнойных осложнений у ожоговых больных на 10–50-е сутки пребывания в стационаре являются *A.baumannii*, *K.pneumoniae* и MRSA (25,8%), *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* и *A.baumannii* (15,2%); *P.aeruginosa* и *A.baumannii* (15,2%); *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae* (15,2%); MRSA и *P.aeruginosa* (15,2%); *K.pneumoniae* и MRSA (6,1%); *A.calcoaceticus*, *Candida albicans* и *K.pneumoniae* (1,0%).

При исследовании чувствительности к антимикробным препаратам изолятов микроорганизмов сем. Enterobacteriaceae, выделенных из биоптатов, раневого отделяемого от ожоговых больных в первые сутки, установили 100% чувствительность к ампициллину, цефтриаксону, цефтазидиму, амоксициллину/клавулановой кислоте,

амикацину, гентамицину, ципрофлоксацину, карбапенемам (рис. 1).

На 10–50-е сутки пребывания в стационаре ожоговых больных чувствительность к антимикробным препаратам изолятов микроорганизмов сем. Enterobacteriaceae значительно снизилась — 100% штаммов резистентны к ампициллину, цефтриаксону, цефазолину, амоксициллину/клавулановой кислоте; 22,2% штаммов чувствительны к амикацину; 18,2% — к ципрофлоксацину; 72,7% — к меропенему и 100% чувствительны к имипенему (рис. 1).

Среди *K.pneumoniae* уровень XDR — 33,3%, MDR — 66,7%; среди *Proteus* spp. — 25 и 75%, соответственно.

Основным механизмом резистентности представителей сем. Enterobacteriaceae является продукция бета-лактамаз расширенного спектра действия. Среди энтеробактерий доля продуцентов БЛРС составила 53% (*K.pneumoniae* — 100%, *Proteus* spp. — 50%).

При исследовании чувствительности к антимикробным препаратам НГОБ, выделенных из биопатов, раневого отделяемого от ожоговых больных в первые сутки, установили 100% чувствительность к цефоперазону/сульбактаму; 66,7% штаммов — к тикарциллину/клавулановой кислоте; 50% штаммов — к цефоперазону, тобрамицину; 70% штаммов — к амикацину, имипенему; 75% штаммов — к меропенему (рис. 1).

На 10–50-е сутки пребывания в стационаре ожоговых больных чувствительность к антимикробным препаратам штаммов НГОБ, значительно снизилась — чувствительность к цефалоспорином и ингибиторозащищенным пенициллинам и цефалоспорином проявляли менее 10% штаммов; 16,7% штаммов чувствительны к амикацину; 5,7% — к ципрофлоксацину; 18,6 и 26,3% штаммов — к меропенему и имипенему соответственно (рис. 1). При оценке полученных данных антибиотикорезистентности выделенные изоляты *P.aeruginosa* и *A.baumannii* являлись полирезистентными.

Среди *A.baumannii* XDR составили 20%, PDR — 67%; среди *P.aeruginosa* 17 и 66% соответственно. Резистентность к карбапенемам штаммов *P.aeruginosa* и *A.baumannii* обусловлена продукцией МБЛ, доля которых составила 37%. Среди штаммов *P.aeruginosa* доля продуцентов МБЛ составила 19%, а среди представителей рода *Acinetobacter* — 33%.

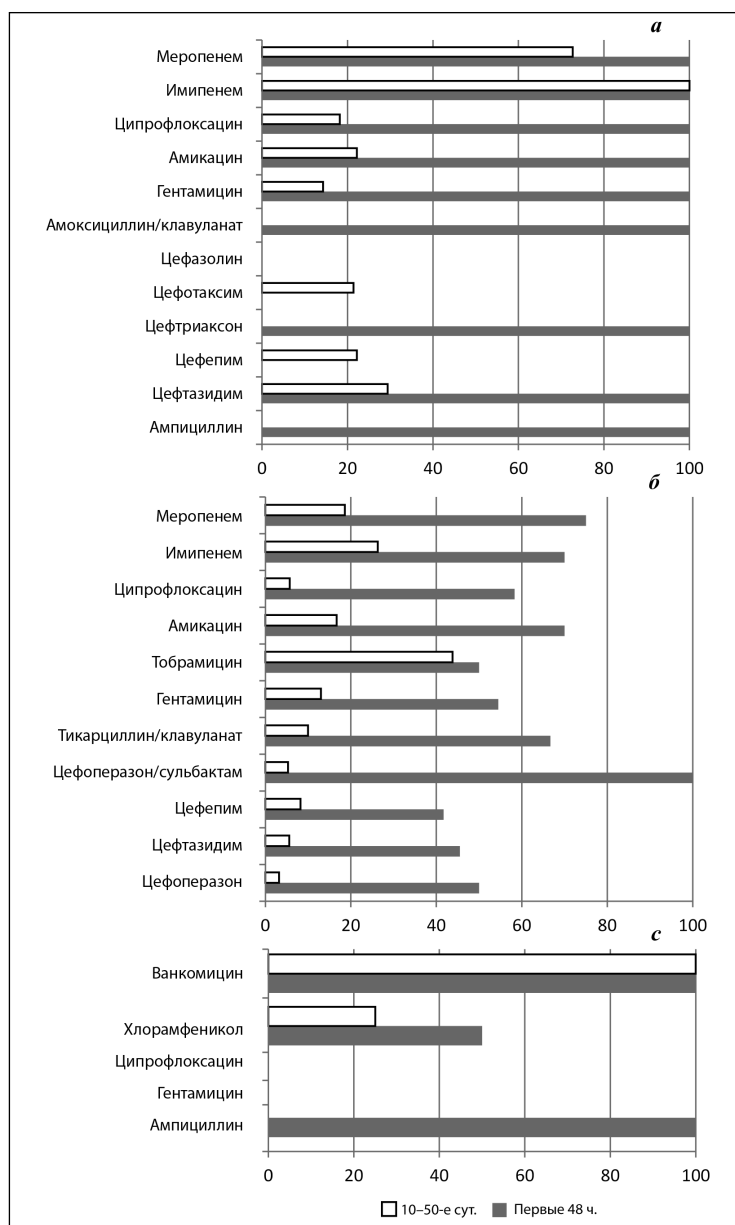


Рис. 1. Результаты чувствительности к антибактериальным препаратам (%).

а — представителей сем. Enterobacteriaceae; **б** — неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.); **в** — штаммов *Enterococcus* spp.

При исследовании чувствительности к антимикробным препаратам штаммов *Enterococcus* spp., выделенных из биопатов, раневого отделяемого от ожоговых больных в первые сутки, установили 100% резистентность к гентамицину, ципрофлоксацину; 50% штаммов чувствительны к хлорамфениколу и 100% — к ампициллину, ванкомицину (рис. 1). На 10–50-е сутки пребывания в стационаре ожоговых больных чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *Enterococcus* spp. снизилась — 100% штаммов резистентны к ампициллину, гентамицину, ципрофлоксацину; 25% штаммов чувствительны к

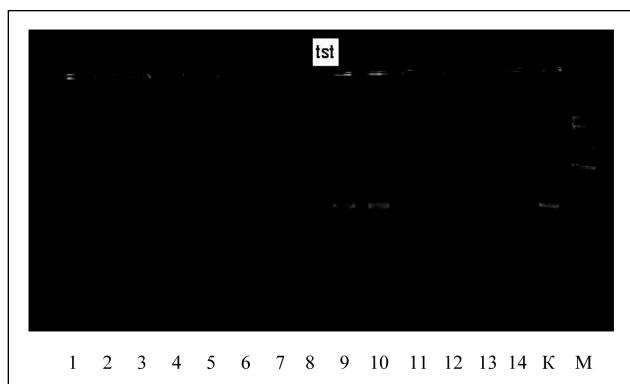
Таблица 2. Характеристика MRSA, выделенных от ожоговых больных в 2013–2015 гг.

Молекулярно-генетические характеристики	Определяемые гены вирулентности	Штаммы MRSA, изолированные от ожоговых больных (n=12)
CC ⁻		8
ST ⁺		239
spa		3 (t037)
SCCmec [*]		III.1.1.2 (IIIА)
agr		I
coa		IV
Токсины:		
Лейкоцидины		
	lukPVSF	—
	lukE-lukD	+
	lukM	—
Гемолизины		
	hla, hlg, hlg-v	+
	hly (split)	(+)
Белковые цитоллизины		
	psmA, hld	+
Энтеротоксины		
	sea	—
	tst	+
	sec, sep	—
	seb, sed, see, seh, set	—
	SapI5 (sek, seq)	+
	sej, seu	—
	egc [*]	—
Эксфолиатины		
	eta, etb, etd	—
Адгезины:		
	c12ag [*]	+
	cna	+
	bbp	—
Резистентность		
Имипенем (МПК, мкг/мл)		64
Оксациллин (МПК, мкг/мл)		>128
Ампициллин (МПК, мкг/мл)		32–64
Ванкомицин (МПК, мкг/мл)		0,5
Аминогликозиды		12/12
Тетрациклины		12/12
Макролиды		12/12
Линкозамиды		12/12
Фторхинолоны		12/12
Рифампицин		12/12
Хлорамфеникол		12/12
Сульфаметоксазол		12/12

Примечание. n=12 — число штаммов, выделенных от разных ожоговых больных, CC⁻ — клональный комплекс, ST⁺ — сиквенс тип, SCCmec^{*} — тип стафилококковой хромосомной кассеты, egc^{*} — кластер генов *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, кодирующих синтез энтеротоксинов, c12ag^{*} — кластер генов *icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, кодирующих синтез адгезинов.

хлорамфениколу; 100% чувствительны к ванкомицину (рис. 1).

Установили, что доля MRSA в первые сутки составила 20%, доля метициллинорезистентных *S. epidermidis* (MRSE) — 0%. На 10–50-е сутки пребывания ожоговых пациентов в стационаре доля MRSA — 62,2%, доля MRSE — 40,0%. Принадлежность к MRSA подтвердили с помощью ПЦР.

**Рис. 2.** Результаты ПЦР для определения гена *tst*, кодирующего синтез токсина синдрома токсического шока у штаммов MRSA, выделенных от ожоговых больных.

Примечание. 9, 10 — номера разных штаммов MRSA, выделенных от разных ожоговых больных; 1–8, 11–14 — номера разных штаммов MRSA, выделенных от здоровых бактерионосителей MRSA; K — контрольный штамм ОСЗ, M — маркер ДНК (100 п.н., 150 п.н., 200 п.н., 300 п.н., 400 п.н., 500 п.н., 600 п.н., 800 п.н., 1000 п.н., 1200 п.н., 1600 п.н., 2000 п.н., 3000 п.н., 4000 п.н., 5000 п.н.) KAPA Universal DNA ladder (KAPA, США).

Для оценки генетического разнообразия изолятов было проведено генотипирование штаммов MRSA. Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными. Выявлено наличие одного клона MRSA, распространённого среди ожоговых больных (табл. 2). Штаммы MRSA были отнесены к генотипу ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/CoaIV. Тип SCCmec III.1.1.2 (IIIА), аналогичен Бразильскому клону (штамм HU25 [23]). В отличие от других ST239 вариантов, выделенные штаммы имели ген *tst*, кодирующего синтез токсина синдрома токсического шока (рис. 2). По остальным признакам штаммы были схожи с линией MRSA ST239, имели в составе ДНК гены *lukED*, гены, кодирующие гемолизины, гены, кодирующие суперантигены (*sek* and *seq*) и гены, кодирующие адгезины, в т.ч. коллаген-адгезин (*cna*). Штаммы MRSA, выделенные от ожоговых больных характеризовались множественной лекарственной устойчивостью — были резистентны к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, рифампицину, хлорамфениколу, сульфаметоксазолу; имели высокий уровень МПК к оксациллину и имипенему (табл. 2). Высокий уровень резистентности к рифампицину (МПК>128 мкг/мл) также является отличительным признаком. Важность мониторинга уровня устойчивости к рифампицину обусловлена тем, что по принципу параллельного ущерба этот признак исследователи рассматривают как предиктор формирования снижения чувствительности к гликопептидам [22]. Все выделенные штаммы MRSA сохраняли чувствительность к ванкомицину (МПК, 0,5 мкг/мл), текопланину, линезолиду, мупироцину, триметоприму, фузидиевой кислоте.

У всех штаммов MRSA выявили наличие крупной плазмиды размером 2,9 т.п.н.

По результатам гель-электрофореза в пульсирующем поле установили полную генетическую однородность штаммов MRSA, выделенных от разных ожоговых больных.

Обсуждение

Гнойные осложнения в ожоговых центрах возникают в 30–50% случаев и являются одной из значимых проблем. Основной задачей лечения ожоговых больных является скорейшее восстановление кожных покровов, однако присоединение инфекции, приводящее к гнойному расплавлению аутодерматрансплантов, является фактором усугубляющим общее тяжёлое состояние пациента и в конечном итоге приводит к прогрессированию явлений ССВО и нарастанию СПОН. Множественная лекарственная устойчивость, а также резистентность к антисептическим препаратам микроорганизмов-возбудителей гнойных осложнений у ожоговых больных определяет их выживаемость в ране и проявляется в формировании толстого фибринозного налёта. Удаление налёта с обширной раневой поверхности приводит к субъективному улучшению состояния пациента, снижению температуры, улучшению самочувствия, уменьшению явлений энцефалопатии. Применение физических методов дебридмента раневой поверхности с использованием современных антисептиков, значительно уменьшает частоту локальных инфекционных осложнений.

По результатам исследования биоптатов, раневого отделяемого ожоговых больных в первые сутки госпитализации рост микроорганизмов получен в 25,5% случаев, доминировали грамположительные микроорганизмы, в частности MSSA (37,8%).

На 10–50-е сутки госпитализации ожоговых больных рост микроорганизмов выявлен в 93,2% случаев; установлено изменение структуры возбудителей гнойных осложнений с увеличением доли полирезистентных микроорганизмов. Грамотрицательная микрофлора (53,4%) занимает одно из ведущих мест в возникновении гнойных осложнений. При этом значительную роль играют НГОВ родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter* — 38,0% от общего числа клинически-значимых штаммов, что является серьёзной проблемой, поскольку они ха-

рактеризуются высокой степенью резистентности к антимикробным препаратам — доля XDR — 18%, доля PDR — 67%. На 10–50-е сутки госпитализации также значительную роль играют стафилококки (38,7%), при этом MRSA составляют 20,9% от общего числа клинически значимых штаммов, а доля MRSA среди выделенных штаммов *S.aureus* значительно возросла (62,2%). Полученные данные свидетельствуют о превалировании микробных ассоциаций мульти- (MDR), экстремально резистентных возбудителей (XDR), а также панрезистентных микроорганизмов (PDR), что необходимо учитывать при планировании и проведении эмпирической терапии.

Значительно возросшую долю резистентных микроорганизмов у ожоговых больных на 10–50-е сутки можно объяснить длительностью антибиотикотерапии, что является селекционным фактором и присоединением госпитальных штаммов. По результатам генотипирования, изучения профиля генов, кодирующих факторы вирулентности, антибиотикорезистентности штаммов MRSA, выделенных от разных ожоговых больных, установлена их полная генетическая однородность, что, вероятно, свидетельствует об их госпитальном происхождении.

Наличие в ране MRSA в ассоциации с *A.baumannii* и *P.aeruginosa* в этиологически значимом количестве приводит практически к тотальному лизису пересаженных аутодерматрансплантатов.

Доминирующими клонами MRSA в России являются ST239/*spa3*(t037)/SCCmecIIA, ST239/*spa351*(t030)/SCCmecIII и ST8/*spa1*(t008)/SCCmecIV [23]. В г. Красноярске распространённым вариантом линии ST239 является уникальный вариант ST239_{Kras}, характеризующийся наличием гена *tst*, кодирующего токсин синдрома токсического шока [24]. Штаммы MRSA, выделенные от ожоговых больных, совпадают по характеристикам с распространённым в г. Красноярске уникальным вариантом ST239_{Kras}. Штаммы MRSA, выделенные от ожоговых больных, характеризуются большим набором факторов вирулентности, антибиотикорезистентности, что значительно отягощает течение гнойных осложнений.

Выражение признательности. Мы благодарим Вей-Чун Хунг и Акихито Нишияма (Япония) за помощь в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Church D., Elsayed S., Reid O., Winston B., Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 403–434.
2. Alexander J.W. Mechanism of immunologic suppression in burn injury. J Trauma 1990; 30 (12 Suppl): S70–75.
3. Griswold J.A. White blood cell response to burn injury. Semin Nephrol 1993; 13: 409–415.
4. Hansbrough J.F., Field T.O. Jr, Gadd M.A., Soderberg C. Immune response modulation after burn injury: T cells and antibodies. J Burn Care Rehabil 1987; 8: 509–512.
5. Heideman M., Bengtsson A. The immunologic response to thermal injury. World J Surg 1992; 16: 53–56.

6. Lederer J.A., Rodrick M.L., Mannick J.A. The effects of injury on the adaptive immune response. Shock 1999; 11: 153–159.
7. Jason P. Heard J.P., McDonald K.M., Xing Y., Kluesner K.M., Liao J. et al. Regional and National Review of Factors Associated With Burn Wound Cellulitis. Journal of Burn Care & Research 2015; 36: 1: 23–32.
8. Винник Ю.С., Маркелова Н.М., Тюрюмин В.С. Современные методы лечения гнойных ран. Сибирское медицинское обозрение. — 2013. — № 1. — С. 18–24. / Vinnik YU.S., Markelova N.M., Tyuryumin V.S. Sovremennyye metody lecheniya gnoynyh ran. Sibirskoe medicinskoe obozrenie 2013; 1: 18–24. [in Russian]
9. Jeschke M.G., Pinto R., Kraft R., Nathens A.B., Finnerty C.C., Gamelli R.L. et al. Morbidity and survival probability in burn patients in modern burn care. Crit CareMed 2015; 43: 808–815.

10. Mann E.A., Baun M.M., Meininger J.C., Wade C.E. Comparison of mortality associated with sepsis in the burn, trauma, and general intensive care unit patient: A systematic review of the literature. *Shock* 2012; 37: 4–16.
11. Alp E., Coruh A., Gunay G.K., Yontar Y., Doganay M. Risk factors for nosocomial infection and mortality in burn patients: 10 years of experience at a university hospital. *J Burn Care Res* 2012; 33: 379–385.
12. Collier J., Gottlieb L.J., Alverdy J.C. Stochasticity among Antibiotic-Resistance Profiles of Common Burn-Related Pathogens over a Six-Year Period Zachary. *Surgical infections* 2017; 18: 3: 327–335.
13. Сабирова Е.В., Гордinskaya H.A., Абрамова Н.В., Некаева Е.С. Антибиотикорезистентность нозокомальных штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных в ожоговом центре в 2002–2008 гг. *Клин микробиол антимикроб химиотер.* — 2010. — Т. 12. — № 1. — С. 77–81. / Sabirova E.V., Gordinskaya N.A., Abramova N.V., Nekaeva E.S. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nyh shtammov *Staphylococcus* spp., vydelennyh v ozhogovom centre v 2002–2008 gg. *Klin mikrobiol antmikrob himioter.* — 2010. — Т. 12. — № 1. — С. 77–81. [in Russian]
14. Воробьева О.Н., Денисенко Л.И., Жилина Н.М. Этиология гнойно-септических процессов у ожоговых больных *Бюллетень СО РАМН.* — 2010. — Т. 30. — № 6. — С. 57–63. / Vorob'eva O.N., Denisenko L.I., Zhilina N.M. Etiologiya gnojno-septicheskikh processov u ozhogovyh bol'nyh *Byulleten' SO RAMN* 2010; 30: 6: 57–63. [in Russian]
15. Самарцев В.А., Еньчева Ю.А., Кузнецова М.В., Карпунина Т.И. Особенности инфицирования ожоговых ран *Новости хирургии.* — 2014. — Т. 22. — № 2. — С. 199–206. / Samarcev V.A., En'cheva YU.A., Kuznetsova M.V., Karpunina T.I. Osobennosti inficirovaniya ozhogovyh ran *Novosti hirurgii* 2014; 22: 2: 199–206. [in Russian]
16. Туркутукоев В.Б., Ибрагимова Т.Д., Шмагунова Е.В. Этиология гнойно-септических осложнений при ожоговой травме и мониторинг чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. *Тихоокеанский медицинский журнал.* — 2012. — № 4. — С. 70–72. / Turkutyukov V.B., Ibragimova T.D., Shmagunova E.V. Etiologiya gnojno-septicheskikh oslozhnenij pri ozhogovoy travme i monitoring chustvitel'nosti mikroorganizmov k antibiotikam. *Tihookeanskij medicinskij zhurnal.* — 2012. — № 4. — С. 70–72. [in Russian]
17. Takano T., Hung W.C., Shibuya M. et al. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 1589–1595.
18. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4961–4967.
19. Kondo Y., Ito T., Ma X.X., Watanabe S., Kreiswirth B.N., Etienne J., Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 264–274.
20. Iwao Y., Khokhlova O.E., Takano T., Hung W.C., Isobe H., Peryanova O.V. et al. Fatal pneumonia in HIV-infected patients from a novel ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the toxic shock syndrome toxin-1 gene in Krasnoyarsk, Siberian Russia. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65: 184–186.
21. Kado and Liu Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365–1373.
22. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Попенко Л.Н., Черненькая Т.В., Наumenko З.С., Ворошилова Т.М. и др. Антибиотикорезистентность метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации. *Антибиотики и химиотер.* — 2015. — Т. 60. — № 1–2. — С. 3–9. / Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Popenko L.N., Chernen'kaya T.V., Naumenko Z.S., Voroshilova T.M. i dr. Antibiotikorezistentnost' metitsillinorezistentnyh *Staphylococcus aureus*, cirkuliruyushchih v Rossijskoj Federacii. *Antibiotiki i himioter.* — 2015. — Т. 60. — № 1–2. — С. 3–9. [in Russian]
23. Романов А.В., Чернов Е.А., Эйдельштейн М.В. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России. *Молекулярная медицина.* — 2013. — № 4. — С. 55–64. / Romanov A.V., Chernov E.A., Ejdelshteyn M.V. Molekulyarnaya ehpidemiologiya vnutribol'nichnyh zolotistyh stafilokokkov v stacionarah razlichnyh regionov Rossii. *Molekulyarnaya medicina.* — 2013. — № 4. — С. 55–64.
24. Khokhlova O.E., Hung W.-C., Wan T.-W. et al. Healthcare- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Fatal Pneumonia with Pediatric Deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's Multiple Virulence Factors, Genome, and Stepwise Evolution. *PloS ONE* 2015; 1: 1–30.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хохлова Ольга Евгеньевна — к.б.н., доцент кафедры микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича, сотрудник Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск

Перьянова Ольга Владимировна — к.б.н., зав. кафедрой микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича, руководитель Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск

Владимиров Иван Владимирович — врач-хирург краевого ожогового центра КГБУЗ «Краевой клинической больницы», Красноярск

Мацкевич Владимир Адамович — зав. отделением, врач-анестезиолог-реаниматолог краевого ожогового центра КГБУЗ «Краевой клинической больницы», Красноярск

Поткина Надежда Константиновна — научный сотрудник Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск

Капишук Дарья Николаевна — преподаватель кафедры микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск

Копытко Людмила Николаевна — зав. бактериологической лабораторией КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Красноярск

Гостев Владимир Валерьевич — к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Сидоренко Сергей Владимирович — д.м.н., профессор, руководитель отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Ивао Ясукиса — PhD, научный сотрудник, Международного медицинского образовательного-исследовательского центра (IMERC) Ниигата, Япония

Ямамото Татсуо — профессор, руководитель Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, руководитель Международного медицинского образовательного-исследовательского центра (IMERC) Ниигата, Япония

Актуальные вопросы эмпирической антимикробной терапии инфекции мочевыводящих путей со стратификацией пациентов по риску антибиотикорезистентности

М. В. ЖУРАВЛЕВА^{1,2}, С. К. ЯРОВОЙ^{3,4}, А. Б. ПРОКОФЬЕВ^{1,2}, Н. Г. БЕРДНИКОВА², Т. М. ПОНОМАРЕНКО², Б. А. РОДИОНОВ⁵, Т. Р. КАМЕНЕВА⁶, Н. Б. ЛАЗАРЕВА², С. Ю. СЕРЕБРОВА^{1,2}, И. В. СУХОБРУС³

¹ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

² Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва

³ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н. А. Лопаткина — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва

⁴ Городская клиническая больница им. Д. Д. Плетнева Департамента здравоохранения г. Москвы

⁵ Городская клиническая больница № 52 ДЗМ, Москва

⁶ Городская клиническая больница № 3 ДЗМ, Москва

Contemporary Approach to Antibiotic Therapy of Urinary Tract Infection

M. V. ZHURAVLEVA^{1,2}, S. K. YAROVY^{3,4}, A. B. PROKOFIEV^{1,2}, N. G. BERDNIKOVA², T. M. PONOMARENKO², B. A. RODIONOV⁵, T. R. KAMENEVA⁶, N. B. LAZAREVA², S. YU. SEREBROVA^{1,2}, I. V. SUKHOBRUS³

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

³ N. A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology, Moscow

⁴ City Clinical Hospital named after D.D. Pletnev of the Dept. of Health, Moscow

⁵ City Clinical Hospital No. 52, Moscow

⁶ City Clinical Hospital No. 3, Moscow

Инфекция мочевыводящих путей (ИМП) — частое инфекционное заболевание или осложнение пребывания пациентов в стационаре. От правильного выбора антибактериального препарата для лечения ИМП зависит эффективность и скорость излечения пациента. Выбор антибактериальной терапии при лечении ИМП должен диктоваться предполагаемым возбудителем. Так как необходимо начинать лечение до получения результатов посева мочи, в терапии ИМП используется эмпирическое лечение антибиотиками широкого спектра действия. Однако это приводит к очень быстрому росту резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Для уменьшения этого эффекта, а также для повышения эффективности лечения необходимо максимально точно выдвигать гипотезу о предлагаемом возбудителе и стараться назначить наиболее подходящий антибиотик. Клиническая ситуация, в которой возникла ИМП может определять вероятного возбудителя, что и будет основой для выбора антибиотикотерапии. В статье предлагаются различные терапевтические стратегии лечения ИМП в зависимости от предлагаемого возбудителя, клинической ситуации и особенностей пациента.

Ключевые слова: инфекция мочевыводящих путей, антибиотикотерапия, антибиотикорезистентность, микробиологический мониторинг.

Urinary tract infection (UTI) is a frequent infectious disease or complication of hospital stay. The effectiveness and the recovery speed of the patient depends on the correct choice of antibacterial drug for the treatment of UTI. The choice of antibacterial therapy in the treatment of UTIs should be dictated by the predicted uropathogen flora. Since it is necessary to start treatment before obtaining the results of urine culture, UTI therapy uses empirical treatment with broad-spectrum antibiotics. However, this leads to a very rapid increase in the resistance of microorganisms to antibiotics. To reduce this effect, as well as to improve the effectiveness of treatment, it is necessary to put forward a hypothesis about the proposed microorganism which caused the UTI as precisely as possible and to try to prescribe the most suitable antibiotic. The clinical situation in which the UTI occurred may determine a probable pathogen, which will be the basis for the choice of antibiotic therapy. The article offers various therapeutic strategies for treatment of UTI, depending on the proposed bacterial flora, the clinical situation, and the characteristics of the patient.

Keywords: urinary tract infection, antibiotic therapy, antibiotic resistance, microbiological monitoring.

Одной из частых причин назначения антибиотикотерапии (АБТ) является инфекция мочевыводящих путей (ИМП). Даже по данным 1997 г.,

до 7 млн обращений к врачу в США было связано с инфекцией мочевыводящих путей [1].

Данные по эпидемиологии ИМП ограничены в связи с тем, что часто такие пациенты пренебрегают обращением к врачу, выбирая лечиться самостоятельно. Также ИМП остаётся недооценённой клиницистами из-за смазанности клиничес-

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 119002, Россия, г.Москва, Петровский бульвар 8, стр. 2. НЦЭСМП МЗ РФ

кой картины и неспецифической симптоматики дизурических явлений, которая часто бывает у пациентов с риском развития ИМП.

Наиболее подвержены ИМП женщины и пожилые люди. Неосложнённая ИМП у женщин случается с частотой 0,7 инфекций на человека в год [2]. Также ИМП самая частая инфекция у пациентов с почечным трансплантатом, более чем у 25% пациентов развивается ИМП в течение 1 года после трансплантации [2]. Особенной группой пациентов подверженных ИМП также являются больные сахарным диабетом (СД).

К ИМП относятся: воспаление мочевого пузыря — цистит, воспаление в непаренхиматозной части почки — пиелонефрит, также выделяют наличие инфекции в моче — бактериурию [3].

Исследования показали, что лечение бессимптомной бактериурии у большинства пациентов не показано и не эффективно [4, 5], единственным исключением является наличие бактериурии при беременности. В остальных случаях, по мнению экспертов, для постановки диагноза ИМП и начала АБТ при наличии бактериурии, необходимо наличие как минимум двух клинических симптомов ИМП [5]. Среди этих симптомов наибольшую диагностическую значимость имеют: острая дизурия, изменения характера мочи и изменения ментального статуса пожилых больных [5]. При этом учащение мочеиспускания или недержание мочи могут случаться у таких пациентов и без наличия инфекции, требующей лечения.

В выборе АБТ при ИМП, как и при других заболеваниях бактериальной этиологии руководствуются, прежде всего, предполагаемым возбудителем. При этом следует иметь виду, что в случае ИМП существуют значительные региональные различия, как по частоте встречаемости возбудителей, так и по спектру их резистентности к антибактериальной терапии [6–10].

Однако существуют и некоторые общие тенденции в этиологии ИМП, которые сохраняются из региона в регион. Так, ИМП чаще всего вызывают грамотрицательные организмы, при этом лидирующее место по-прежнему занимает *Escherichia coli* [11, 12].

При этом в последние годы стала отмечаться более частая высеваемость грамположительных *Enterococcus* spp. в образцах мочи в стационарных условиях, что вероятно связано с ростом резистентности уропатогенов к проводимой терапии [12].

В профиле возбудителей ИМП наблюдаются гендерные различия, что связано с анатомическими особенностями мочевыводящих путей. У мужчин чаще, чем у женщин развитие ИМП связано с инфицированием *Pseudomonas aeruginosa* и заражением бактериями с множественной резистентностью [9, 12].

В терапии острого цистита рекомендуется отдавать предпочтение «местным» антибактериальным препаратам, таким как нитрофурантоин и фосфомицин. Их многолетнее использование при цистите привело к минимальным изменениям в резистентности микроорганизмов и редко приводит к развитию таких осложнений АБТ, как псевдомембранозный колит и антибиотик-ассоциированная диарея [13], что может быть особенно важно в терапии пожилых пациентов. Риск развития резистентности уропатогенов к антибиотикам широкого спектра диктует необходимость минимально использовать их при циститах, чтобы снизить количество полирезистентных штаммов.

В терапии неосложнённого пиелонефрита к терапии могут быть рекомендованы следующие препараты: фосфомицин, нитрофурантоин, цефалоспорины III–IV поколений, ингибитор-защищенные пеницилины, аминогликозиды и карбапенемы [8, 12]. При этом следует иметь в виду, что резистентность уропатогенов к антибиотикам растёт очень быстро, и сейчас все чаще встречается резистентность к бета-лактамам антибиотикам. В таких случаях возможно использование аминогликозидов, колистина и тигециклина [8].

Ещё в 2004 г., по данным крупного многоцентрового российского исследования UTIAP-I и UTIAP-II, была выявлена высокая резистентность основных возбудителей неосложнённых ИМП к ампициллину и ко-тримоксазолу, при сохранении высокой микробиологической активности фторхинолонов, ингибиторзащищенных пеницилинов, нитрофурантоина, цефуроксима [14].

Однако в настоящее время лидирующие позиции фторхинолонов в терапии ИМП пошатнулись. Хотя они звучат в рекомендациях 2011 г. в терапии ИМП [6], в настоящее время резистентность к фторхинолонам достигает 10 и более процентов [6]. По данным французского исследования, с 2011 по 2012 гг. резистентность к фторхинолонам возросла на 8% [15]. Ряд исследований показал, что фторхинолоны не должны применяться для эмпирической терапии этих ИМП [9], особенно у мужчин, в виду часто наблюдаемой резистентности, которая увеличивается с возрастом (после 65 лет) [5].

Так же было показано, что резистентность уропатогенных бактерий к цефалоспорином 3-го поколения за 7 лет увеличилась на 9% [15].

Важной особенностью пациентов, которая может влиять на выбор антимикробной терапии ИМП является снижение иммунитета различного происхождения. Например, при наличии сахарного диабета любого типа чаще отмечается присутствие грамположительной флоры (за счёт *Enterococcus* spp.), снижается частота присутствия *E. coli* [16–18], а также у этих пациентов может отмечаться инфицирование анаэробными организмами [19].

Исходя из этих особенностей препаратами выбора для стартовой терапии ИМП у больных СД должны стать ингибиторозащищенные аминопенициллины, имеющие высокую активность не только против грамотрицательных, но и грамположительных микроорганизмов. Эти данные подтвердились в работе Бутрановой и соавт., которые провели ретроспективный анализ 280 историй болезней пациентов из стационаров Волгограда, и показали что наибольший уровень резистентности у больных СД был обнаружен к цефалоспорином, ампициллину, амоксициллину и левофлоксацину. Максимальная чувствительность отмечалась в случае амикацина, однако в виду его нефротоксичности ингибитор-защищенные пенициллины являются более предпочтительными препаратами [18]. Важно также отметить, что среди пациентов с СД наилучшая профилактика развития ИМП — это контроль уровня гликемии [20].

Также изменяется спектр уропатогенной флоры при наличии поздних стадий ВИЧ инфекции: повышается частота выявления *Streptococcus* spp. и *Salmonella* spp. И отмечается склонность к микстинфекции [21]. Таким пациентам целесообразно назначать комбинированную терапию с максимально широким спектром активности, но в отношении негоспитальных штаммов. Для этого подходят комбинации следующих препаратов амоксициллин/клавуланат+амикацин+флюконазол или фторхинолон+нитроимидазол+флюконазол.

Особенностью ИМП у внутривенных наркоманов является частый гематогенный путь развития инфекции и частое проникновение инфекции с кожи, то есть ИМП у внутривенных наркоманов обычно вызывает *Staphylococcus* причем как метициллин-чувствительный, так и метициллинрезистентный. В качестве эмпирической терапии таким пациентам подходит ингибиторзащищенный пенициллин+амикацин в высокой дозе и парентерально, либо ванкомицин, при высокой уверенности в стафилококковой природе инфекции.

Следует помнить, что пиелонефрит развившийся гематогенным путём, например, на фоне эндокардита или септицемии другого происхождения, обычно связан с грамм-положительной инфекцией [22], и выбор антибактериального препарата для лечения ИМП будет диктоваться основным заболеванием.

Отдельную проблему составляет нозокомиальная ИМП. На их долю приходится около 40% от всех нозокомиальных инфекций, в большинстве случаев такие инфекции обусловлены катетеризацией мочевого пузыря, что приводит к частому развитию микст-инфекций [23]. В среднем время контаминации мочевых путей госпиталь-

ными штаммами составляет около 7 суток, но при наличии дренирующих систем полирезистентные внутрибольничные штаммы могут высеваться уже на 2—5-е сутки [23].

Очень важно в терапии такой инфекции хорошо знать чувствительность нозокомиальных штаммов конкретного региона и учреждения и назначать АБТ с учётом конкретной чувствительности [6, 7], так как отмечаются широкие региональные различия по профилю чувствительности возбудителей ИМП к АБТ.

Катетер-ассоциированная инфекция нижних мочевых путей характеризуется высокой частотой высеваания представителей вида *P.aeruginosa* (37,5%) и рода *Enterococcus* spp. (31%) [23].

В случае нозокомиальной ИМП почечного трансплантата ведущее положение занимает *E.coli*, часто не чувствительная к беталактамам (ESBL), а также *Klebsiella pneumoniae* [24, 25], по некоторым стационарам частота грамположительного пиелонефрита трансплантата приближается к 40,0% (*Enterococcus* spp.) [26].

Данные о чувствительности к фторхинолам в терапии нозокомиальной ИМП очень разнятся в зависимости от региона, так по данным Пензенского государственного университета 2012 года чувствительность госпитальных штаммов, вызывавшим ИМП составила 75% [23], тогда как по недавним данным московских многопрофильных стационаров чувствительность к фторхинолонам менее 30%, что не позволяет использовать их в терапии нозокомиальной инфекции. Схожие данные получены и по цефалоспорином III—IV поколения. Все это очень ограничивает выбор эмпирической терапии при нозокомиальной ИМП.

В настоящее время по данным московских многопрофильных стационаров один из наименьших уровней резистентности демонстрируют амикацин (12%), карбапенемы (до 30% в зависимости от конкретного препарата) и колистин.

Как уже говорилось выше, проблема антибиотикорезистентности стоит не только в отношении нозокомиальной инфекции, но отмечается её нарастание и у амбулаторных пациентов. Для корректного выбора эмпирической терапии ИМП рекомендуется использовать стратификацию пациентов по риску антибиотикорезистентности [27].

К факторам риска антибиотикорезистентности относятся:

- характер инфекции;
- обращение за медицинской помощью или госпитализация в последнее время;
- предшествующая АБТ;
- наличие сопутствующей патологии.

Также могут быть и другие дополнительные факторы заражения полирезистентной флорой. По этим параметрам можно выделить 4 типа пациентов [27].

I тип — пациенты, у которых не стоит ожидать полирезистентной флоры — это пациенты с внебольничной инфекцией, не обращавшиеся за медицинской помощью в последние 3 мес и не получавшие антибиотики в течение последних 90 дней, а также не имеющие сопутствующей патологии. Возможности эмпирической терапии таких пациентов довольно широки.

II тип — пациенты, у которых можно обнаружить ESBL бактерии — это пациенты с нозокомиальной инфекцией, обращавшиеся за помощью или госпитализировавшиеся в последние 3 мес, получавшие антибиотики за последние 90 дней, с тяжёлой сопутствующей патологией, а также выезжавшие в регионы с высоким уровнем полирезистентной флоры. Для терапии таких пациентов могут потребоваться антибиотики резерва.

IIIa тип — это также пациенты с риском заражения ESBL бактериями, но с другим набором факторов риска — это пациенты с нозокомиальной инфекцией, пребывавшие в стационаре более 7 дней, а в ОРИТ более 3, без оперативных вмешательств и не получавшие АБТ более 24 ч, наличие сопутствующей патологии значения не имеет.

IIIb тип — пациенты как с риском заражения ESBL бактериями, так и опасностью развития MRSA и *P.aeruginosa*, к таким пациентам относятся: пребывавшие в стационаре более 7 дней, а в ОРИТ более 3, с развитием инфекции после оперативного вмешательства, получающие антибиотик и имеющие тяжёлые коморбидные состояния. Для терапии этих пациентов важно задействовать антибиотики с учётом данных микробиологического мониторинга.

IV тип — пациенты, которые кроме риска заражения полирезистентной флорой имеют и риск развития грибковой инфекции — это все пациенты типа III, у которых отмечается лихордка выше 38°C в течение более 6 дней на фоне адекватной АБТ и санации очага инфекции, у которых отмечается распространённая колонизация *Candida spp.* и есть риск развития инвазивного кандидоза, такой как внутривенный катетер, лапаротомия, выраженный мукозит, полное парентеральное питание, применение иммуносупрессоров и возможна была предшествующая терапия азолами. Этим пациентам обязательно показано назначение противогрибковых препаратов.

Традиционно выделяют развитие ИМП на фоне обструкции мочевыводящих путей. Однако при этом заболевании преобладающими микробными агентами также является *E.coli* (31%) и *P.aeruginosa* (17%), значение грамположительной флоры невелико [23]. Следует помнить, что главное в терапии ИМП на фоне обструкции это как можно более быстрое разрешение обструкции, при этом по данным некоторых исследователей чрескожная нефростомия обеспечи-

вает лучшее клиническое излечение, чем стентирование мочеточника, независимо от выбранных режимов лекарств [28]. Что же касается АБТ предпочтение стоит отдавать антисинегнойным цефалоспорином, например цефтазидиму. По данным недавнего исследования его эффективность в сравнении с ципрофлоксацином составила 95,2% против 83,6% у ципрофлоксацина ($p < 0,05$) [28].

Затруднения в выборе АБТ ИМП могут быть связаны не только с проблемами диагностики возбудителя или его резистентности, но и с проблемами безопасности её применения.

Например, при лечении ИМП на фоне хронической почечной недостаточности (ХПН) ограничено применение аминогликозидов. В некоторых случаях их возможно заменить цефалоспоринами с антисинегнойной активностью или карбапенемами, в других можно назначить и аминогликозиды, но с пересчётом дозы в зависимости от скорости клубочковой фильтрации (СКФ), хотя стартовая доза должна оставаться среднетерапевтической, так как в противном случае не будет достигнут достаточный антибактериальный эффект [29].

При аллергической реакции на ингибитор-защищённые пенициллины рекомендуется использовать парантеральные формы макролидов, так же возможно использование фторхинолонов, если резистентность к ним не слишком высока, или фосфомицина-натрия [6].

При развитии ИМП на фоне беременности выбор препарата ограничен в виду возможности опасного влияния на плод. По данным спонтанных сообщений, поступивших в Росздравнадзор за 2015 год, 1,54% составили нежелательные реакции, связанные с применением лекарственных препаратов во время беременности [30]. При этом часть нежелательных реакций (15,7%) была связана с применением лекарств, которые либо противопоказаны беременным, либо в исследованиях на животных показали отрицательное влияние на плод [30]. Поэтому мы считаем нужным акцентировать внимание на этой группе пациенток.

Беременные относятся к группе пациентов, которым необходимо проводить лечение бессимптомной бактериурии [31]. При этом рекомендуются обычные сроки антибактериальной терапии (10—14 дней), так как получено недостаточно данных об эффективности более коротких режимов терапии [32].

Выбор антибактериального препарата сводится к ингибиторозащищённым пенициллинам и цефалоспорином III поколения, так как они зарекомендовали себя, как наиболее безопасные для плода [33]. При невозможности их назначения может быть использован фосфомицин-натрия [33].

Выводы

1. При выборе эмпирической антибактериальной терапии необходимо учитывать пол пациентов, так как у мужчин причиной развития болезни чаще является *P.aeruginosa* и резистентные штаммы бактерий.

2. Для эмпирической терапии неосложненной внебольничной ИМП в большинстве случаев могут подойти ингибиторозащищенные пенициллины, а в случае острого цистита препараты нитрофурантоина и фосфомицина.

3. Фторхинолоны могут применяться в терапии пиелонефрита в качестве эмпирической терапии, однако их применение при остром цистите следует ограничить.

4. Для терапии пациентов с сахарным диабетом препараты выбора в лечении ИМП — ингибиторозащищенные пенициллины.

5. В терапии ИМП у пациентов с поздней стадией ВИЧ-инфекции подходят комбинации ингибиторозащищенных пенициллинов и фторхинолонов с аминогликазидами и противогрибковыми препаратами.

6. В терапии нозокомиальной ИМП выбор антибактериального препарата проводится в со-

ответствии с данными о внутрибольничной флоре и её резистентности. А также с учётом стратификации риска пациентов по уровню антибиотикорезистентности.

7. При наличии обструкции мочевых путей наиболее предпочитаемые антибактериальные препараты — цефалоспорины с антисинегнойной активностью.

8. Лечение бессимптомной бактериурии показано только беременным пациенткам в виду высокого риска развития осложнений беременности. В остальных случаях лечение бактериурии мало эффективно и приводит лишь к увеличению резистентности уропатогенной флоры к антибактериальной терапии.

Рациональная фармакотерапия ИМП обеспечивает быстрое излечение пациентов, профилактику развития осложнений и является экономически выгодной стратегией ведения пациентов, именно поэтому важно, чтобы клиницисты хорошо ориентировались в многообразии антибактериальных препаратов и могли выбрать наиболее подходящий для их пациента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schappert S.M. Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments: United States, 1997. Vital Health Stat 13. 1999; 143: 1—39.
2. Ayan S., Stephen W.L. Urinary Tract Infections, Complicated. Stat Pearls Publishing 2017 Jun.
3. Премашвили В.В. Инфекции мочевыводящих путей: современный взгляд на проблему. РМЖ 2007; 29: 2231.
4. Ronald A.R., Nicolle L.E., Stamm E., Krieger J., Warren J., Schaeffer A. et al. Urinary tract infection in adults: research priorities and strategies. Int J Antimicrob Agents. 2001; 17: 343—348.
5. Mody L., Juthani-Mehta M. Urinary Tract Infections in Older Women: A Clinical Review JAMA. 2014 February 26; 311 (8): 844—854.
6. Infectious Diseases Society of America; European Society for Microbiology and Infectious Diseases. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. Clin Infect Dis 2011; 52 (5): e103—20.
7. Tandogdu Z.I., Wagenlehner F.M. Global epidemiology of urinary tract infections. Curr Opin Infect Dis 2016 Feb; 29 (1): 73—79.
8. Bader M.S., Loeb M., Brooks A.A. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. Postgrad Med 2017 Mar; 129 (2): 242—258. doi: 10.1080/00325481.2017.1246055. Epub 2016 Oct 21.
9. Linhares I., Raposo T., Rodrigues A., Almeida A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000—2009) BMC Infect Dis 2013; 13: 19.
10. Hirsch E.B., Zucchi P.C., Chen A., Raux B.R., Kirby J.E., McCoy C. et al. Susceptibility of multidrug-resistant gram-negative urine isolates to oral. Antimicrob Chemother May 2016; 60: 5.
11. National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse (NKUDIC). Accessed on 7th Nov 2014
12. Почерников Д. Г., Стрельников А. И., Шабаетов Г. Л. Этиология и частота встречаемости инфекций мочевыводящих путей в урологической клинике ИвГМА. Вестник ИвГМА. 2009; 1. / Pochernikov D. G., Strel'nikov A. I., Shabaev G. L. Jetiologija i chastota vstrechaemosti infekcij mochevyvodjashhikh putej v urologicheskoj klinike IvGMA. Vestnik IvGMA. 2009; 1. [in Russian]
13. Paterson D.L. «Collateral damage» from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy, Clin Infect Dis 2004; 38 Suppl: 4—5.
14. Рафальский В.В., Страчунский Л.С., Кречикова О.И., Эйдельштейн И.А., Ахметова Л.И., Бабкин П.А. и др. Резистентность возбудителей амбулаторных инфекций мочевыводящих путей по данным многоцентровых микробиологических исследований UTIAP-I и UTIAP-II. В. Урология 2004; 2: 13—17. / Rafal'skij V.V., Strachunskij L.S., Krechikova O.I., Jeidel'shtejn I.A., Akhmetova L.I., Babkin P.A. i dr. Rezistentnost' vozбудitelej ambulatornykh infekcij mochevyvodjashhikh putej po dannym mnogocentrovnykh mikrobiologicheskikh issledovanij UTIAP-I i UTIAP-II. V. Urologija 2004; 2: 13—17. [in Russian]
15. Antibiotic therapy for acute uncomplicated pyelonephritis in women. Take resistance into account. Prescrire Int 2014 Dec 23 (155): 296—300.
16. Локшин К.Л., Винаров А.З., Морозова Е.А., Дымов А.М., Пшихачев А.М. Современные тенденции изменения устойчивости нозокомиальных инфекций в клинике урологии Первого МГМУ им. Сеченова. Материалы XII съезда Российского общества урологов, М.: 2012; 143. / Lokshin K.L., Vinarov A.Z., Morozova E.A., Dymov A.M., Pshikhachev A.M. Sovremennye tendencii izmenenija ustojchivosti nozokomial'nykh infekcij v klinike urologii Pervogo MG MU im. Sechenova. Materialy XII s#ezda Rossijskogo obshhestva urologov, M.: 2012; 143. [in Russian]
17. Думов В.В. Современные аспекты диагностики и лечения мочекаменной болезни у пациентов пожилого и старческого возраста. РМЖ 2014; 29: 44—48. / Dutov V.V. Sovremennye aspekty diagnostiki i lechenija mochekamennoj bolezni u pacientov pozhilogo i starcheskogo vozrasta. RMZh 2014; 29: 44—48. [in Russian]
18. Бутранова О.И., Сыродоева Н.Г. Фармакоэпидемиологический анализ антибактериальной терапии пациентов с инфекциями мочевыводящих путей на фоне сахарного диабета типа 2. Вестник ВолГМУ 2015; 2 (54). / Butranova O.I., Syrodоеva N.G. Farmakojeepidemiologicheskij analiz antibakterial'noj terapii pacientov s infekcijami mochevyvodjashhikh putej na fone sakharnogo diabete 2 tipa. Vestnik VolGMU 2015; 2 (54). [in Russian]
19. Набока Ю.Л., Волкова Н.И., Гудима И.А., Избенко В.С. Микробный спектр мочи при декомпенсированном сахарном диабете 2 типа. Материалы XII съезда Российского общества урологов, Москва. 2012. С.146—147. / Naboka Ju.L., Volkova N.I., Gudima I.A., Izbenko V.S. Mikrobnij spektr mochi pri dekompensirovannom sakharnom diabete 2 tipa. Materialy XII s#ezda Rossijskogo obshhestva urologov, Moskva. 2012. S.146—147. [in Russian]
20. Sharma S., Govind B., Naidu S.K., Kinjarapu S., Rasool M. Clinical and Laboratory Profile of Urinary Tract Infections in Type 2 Diabetics Aged over 60 Years Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2017 Apr, 11 (4): OC25-OC28.
21. Vignesh R., Shankar E.M., Murugavel K.G., Kumarasamy N., Sekar R., Irene P. et al. Urinary infections due to multi-drug-resistant *Escherichia coli* among persons with HIV disease at a tertiary AIDS care centre in South India. Nephron Clin Pract 2008; 110 (1): e55-7. Epub 2008 Aug 25.

22. Лопаткин Н.А. Урология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2009; 1021. / Lopatkin N.A. Urologija. Nacional'noe rukovodstvo. M.: GJeOTAR-Media. 2009; 1021. [in Russian]
23. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л., Галкина Н.Г., Бурко П.А. Ретроспективный анализ эколого-эпидемиологических особенностей нозокомиальных инфекций в отделении урологии многопрофильного стационара. Мед альманах 2012; 3. / Mitrofanova N.N., Mel'nikov V.L., Galkina N.G., Burko P.A. Retrospektivnyj analiz jekologo-jepidemiologicheskikh osobennostej nozokomial'nykh infekcij v otdelenii urologii mnogoprofil'nogo stacionara. Med al'manakh 2012; 3. [in Russian]
24. Ak O., Yildirim M., Kucuk H.F., Gencer S., Demir T. Infections in renal transplant patients: risk factors and infectious agents. Transplant Proc 2013; 45: 3: 944-948.
25. Silva C., Afonso N., Macário F., Alves R., Mota A. Recurrent urinary tract infections in kidney transplant recipients. Transplant Proc 2013; 45: 3: 1092-1095.
26. Будникова Н.Е. Трансплантация почки и бактериальные инфекции: профилактика, диагностика, комплексная терапия и организация лечебного процесса. [диссертация]. М.: 2004; 132-150. / Budnikova N.E. Transplantacija pochki i bakterial'nye infekcii: profilaktika, diagnostika, kompleksnaja terapija i organizacija lečebnogo processa. [dissertacija]. M.: 2004; 132-150. [in Russian]
27. Программа SKAT (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи. Российские клинические рекомендации 2017. / Programma SKAT (Strategija Kontrolja Antimikrobnaj Terapii) pri okazanii stacionarnoj medicinskoj pomoshhi. Rossijskie klinicheskie rekomendacii 2017. [in Russian]
28. Pasiechnikov S., Buchok O., Sheremeta R., Banyra O. Empirical treatment in patients with acute obstructive pyelonephritis. Infect Disord Drug Targets 2015; 15 (3): 163-170.
29. Шашкова Г.В., Перепанова Т.С., Бешилев Д.А. Лекарственные средства, применяемые в урологии. Москва. РЦ «ФАРМЕДИНФО». 2002; 246. / Shashkova G.V., Perepanova T.S., Beshliev D.A. Lekarstvennye sredstva, primenjaemye v urologii. Moskva. RC «FARMEDINFO». 2002; 246. [in Russian]
30. Журавлева Е.О., Вельц Н.Ю., Затолочина К.Э., Глаголев С.В., Поливанов В.А., Дармостукова М.А. и др. Анализ спонтанных сообщений о нежелательных реакциях развившихся при применении лекарственных средств в течение беременности. Безопасность и риск фармакотерапии 2017; 5 (2): 61-69. / Zhuravleva E.O., Vel'c N.Ju., Zatolochina K.E., Glagolev S.V., Polivanov V.A., Darmostukova M.A. i dr. Analiz spontannykh soobshhenij o nezhelatel'nykh reakcijakh razvivshixsja pri primenenenii lekarstvennykh sredstv vovremja beremennosti. Bezopasnost' i risk farmakoterapii 2017; 5 (2): 61-69. [in Russian]
31. Gilstrap L.C. 3rd, Ramin S.M. Urinary tract infections during pregnancy. Obstet Gynecol Clin North Am. 2001 Sep. 28 (3): 581-591.
32. Widmer M., Gülmezoglu A.M., Mignini L., Roganti A. Duration of treatment for asymptomatic bacteriuria during pregnancy. Cochrane Database Syst Rev. 2011.
33. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Смоленск, МАК-МАКС, 2007; 464. / Strachunskij L.S., Belousov Ju.B., Kozlov S.N. Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfekcionnoj khimioterapii. Smolensk, MAKMAKS, 2007; 464. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Журавлева М.В. — д.м.н., профессор, Зам. директора Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Прокофьев Алексей Борисович — д.м.н., профессор, директор Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Сереброва Светлана Юрьевна — д.м.н., главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Разработка методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции «бусерелина ацетат» методом ЯМР спектроскопии без использования фармакопейного стандартного образца

Н. Е. КУЗЬМИНА, С. В. МОИСЕЕВ*, В. И. КРЫЛОВ, В. А. ЯШКИР, В. А. МЕРКУЛОВ

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

Development of a Procedure for the Identification of Pharmaceutical Substance «Buserelin Acetate» by NMR Spectroscopy without Using Pharmacopoeia Reference Standard

N. E. KUZMINA, S. V. MOISEEV*, V. I. KRYLOV, V. A. YASHKIR, V. A. MERKULOV

Scientific centre for expert evaluation of medical products of the Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

На основе комплексного анализа спектральных данных ЯМР (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC) проведена идентификация образца бусерелина ацетата без использования фармакопейного стандартного образца. Определены параметры ЯМР эксперимента, позволяющие получить спектры, в которых соотношение сигнал/шум (S/N) выше 50:1 (^1H) и 10:1 (^{13}C). Показана нецелесообразность использования сигнала ацетат-аниона для калибровки шкалы химических сдвигов спектров водного раствора бусерелина ацетата. Сделано предположение о влиянии скорости прототропной таутомерии на исчезновение в спектре ^{13}C сигналов углеродных атомов в положениях 4 и 5 имидазольного цикла в L-гистидиновом фрагменте бусерелина ацетата.

Ключевые слова: бусерелина ацетат, подлинность, метод ЯМР, стандартный образец.

The identification of the buserelin acetate sample was carried out without using the pharmacopoeia reference standard. The identification was based on the spectral NMR data (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC) complex analysis. NMR experiment parameters were determined for the obtaining of spectra with S/N ratio above 50:1 (^1H) and 10:1 (^{13}C). The inexpediency of using the acetate anion signal for calibration of the scale of chemical shifts in the spectra of an aqueous solution of buserelin acetate is shown. The assumption about the effect of the speed of prototropic tautomerism on the disappearance of signals of carbon atoms in positions 4 and 5 of the imidazole ring in the L-histidine fragment of buserelin acetate was made.

Keywords: buserelin acetate, identification, NMR spectroscopy, reference standard.

Введение

Бусерелина ацетат (5-оксо-L-пролил-L-гистидил-L-триптофил-L-серил-L-тирозил-O-трет-бутил-D-серил-L-лейцил-L-аргинил-L-пролил-N-этиламид ацетат) представляет собой синтетический олигопептид — аналог природного гонадотропин-рилизинг гормона. Он применяется в медицине при лечении эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия, раковых образований молочных желез, гормонозависимых раковых образований предстательной железы, миомы матки, бесплодия [1–3].

Важным этапом контроля качества фармацевтической субстанции «бусерелина ацетат» (БА) является подтверждение его подлинности. На

практике эта процедура осуществляется, как правило, путём сравнения УФ-спектра и (или) хроматограммы испытуемого образца субстанции с УФ-спектром и (или) хроматограммой фармакопейного стандартного образца (ФСО) [4]. Следует отметить, что в настоящее время отечественные стандартные образцы (СО) не производятся, а вместо них применяют зарубежные (Европейская, Британская фармакопеи и Фармакопея США). Основное ограничение в использовании зарубежных ФСО связано с их большой стоимостью и длительными сроками поставки производителем. Поэтому при их отсутствии допускается проводить рутинные анализы по подтверждению подлинности действующего вещества, используя рабочие СО, идентичность которых доказывают несколькими альтернативными методами.

Одним из наиболее эффективных методов идентификации структуры СО является метод

© Коллектив авторов, 2017

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

Таблица 1. Влияние параметров ЯМР — эксперимента на величину S/N

с, мг/мл	D ₁ , с	N	S/N	Длительность эксперимента	с, мг/мл	D ₁ , с	N	S/N	Длительность эксперимента
¹ H									
1	1	256	53,3	16 мин	5	1	16	56	1 мин
1	5	128	53,8	16 мин 29 с	5	5	4	58	31 сек
2,5	5	64	60,4	8 мин 14 с	10	1	1	50	4 с
¹³ C									
5	1	10000	5,8	5 ч 37 мин	20	1	1500	8,1	47 мин
10	1	4500	9,6	2 ч 19 мин	20	1	2000	10,4	1 ч 2 мин
10	1	5000	10,0	2 ч 35 мин	20	2	1000	7,7	48 мин
10	2	5000	11	4 ч	20	2	1500	11,2	1 ч 11 мин

ЯМР спектроскопии [5, 6]. Он позволяет фиксировать наличие в молекулярной системе определённых структурных фрагментов и последовательность их соединения друг с другом [7].

Цель данного исследования — разработка методики подтверждения подлинности БА методами ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии для её дальнейшего использования в контроле качества субстанций и при создании рабочих стандартных образцов БА.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использовали образец лекарственной субстанции БА производства ЗАО «Ф-Синтез», Россия (серия 02042017). Варьируемые навески анализируемого образца растворяли в 0,5 мл дейтерированного растворителя (D₂O или DMSO-d₆) производства Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Для калибровки шкалы химических сдвигов (δ) в водный раствор испытуемого образца добавляли 10 мкл аналитического стандарта 1,4-диоксана производства Fluka. Регистрацию спектров ¹H, ¹³C, ¹H-¹H gCOSY, ¹H-¹³C gHSQC, ¹H-¹³C gHMBC проводили при температуре 25°C на ЯМР спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США) с 5-мм мультиядерным датчиком, оснащённым градиентной катушкой.

Результаты исследования

Основная задача, решаемая при разработке методики подтверждения подлинности соединения методом ЯМР спектроскопии, заключается в структурной интерпретации спектральных данных, то есть в соотношении каждого сигнала в спектрах ЯМР с конкретным структурным фрагментом соединения. Поэтому при разработке такого типа методик на начальном этапе исследований подбирают условия эксперимента, обеспечивающие появление достаточно интенсивных сигналов (удовлетворительное значение отношения сигнал/шум S/N).

Европейская фармакопея при проверке идентичности олигопептидов методом ¹H ЯМР рекомендует руководствоваться минимальной величиной S/N = 50 [8]. При переходе к менее чувствительному методу ¹³C ЯМР мы ориентировались на требования к пределу количественного обнаружения вещества (S/N = 10) [9].

На величину S/N влияет целый ряд параметров ЯМР-эксперимента, наиболее значимыми

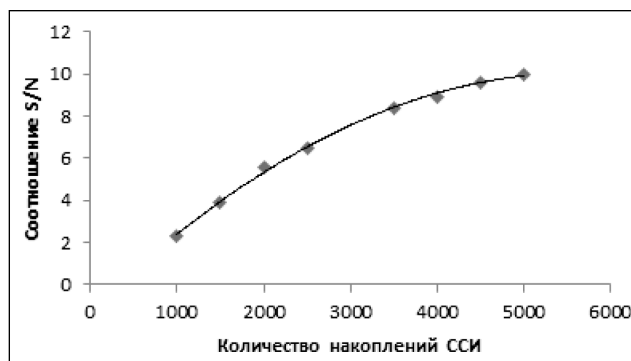


Рис. 1. Графическая зависимость величины S/N от числа накоплений ССИ в спектре ¹³C БА (D₂O, с=10 мг/мл, D₁=1 с).

являются концентрация исследуемого образца (с), время релаксации и число накоплений (n) сигнала спада свободной индукции (ССИ). Оптимальные значения этих параметров устанавливали, используя растворы БА в D₂O. Соотношение S/N измеряли на сигналах с наименьшей интенсивностью. В спектрах ¹H это мультиплетные сигналы пирролидинового фрагмента L-Pro, в спектрах ¹³C — сигналы карбонильных групп и четвертичных атомов углерода L-His и L-Trp. Концентрацию подбирали таким образом, чтобы спектры ¹H и ¹³C, снятые с одного раствора образца, удовлетворяли требованиям к величине S/N. Результаты подбора оптимальных параметров эксперимента представлены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, качественный протонный спектр (S/N>50) можно получить при концентрации с = 1 мг/мл (7,7×10⁻⁴ ммоль/мл). Для регистрации спектра ¹³C с S/N≥10 необходимо увеличивать концентрацию БА или значительно увеличивать число накоплений ССИ. Ранее мы показали, что графическая зависимость величины S/N от n имеет форму, близкую к параболической [10]. Экспериментальные данные, представленные на рис. 1, хорошо согласуются с этим выводом и показывают нецелесообразность увеличения соотношения S/N за счёт большого накопления ССИ.

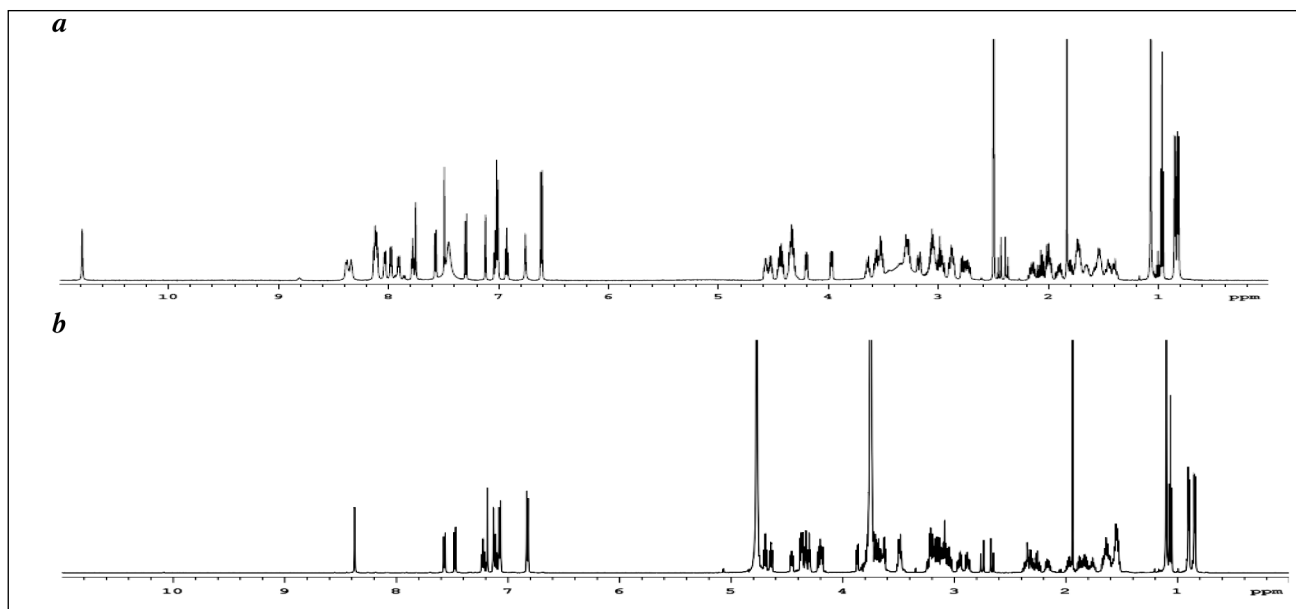


Рис. 2. Спектры ^1H растворов бусерелина ацетата в D_2O (a) и DMSO-d_6 (b)

Как видно из табл. 1, увеличение времени релаксации, существенно повышая время проведения эксперимента, также не ведёт к значительному росту S/N . Для получения спектра ^{13}C , удовлетворяющего требованию $S/N \geq 10$, необходимо использовать концентрации растворов БА не менее 10 мг/мл. Увеличение концентрации до 20 мг/мл ($D_1=1$ с; $n=2000$) сокращает время эксперимента до 1 ч. Дальнейшие исследования мы проводили, используя параметры $c=20$ мг/мл, $D_1=1$, $n=1(^1\text{H})$ и 2000 (^{13}C).

На следующем этапе разработки методики подбирали внутренний эталон для калибровки шкалы δ . При растворении в DMSO-d_6 целесообразно использовать в этом качестве сигнал дейтерированного растворителя ($\delta=2,50$ (^1H) и 39,52 м.д. (^{13}C) [10]). Для водных растворов олигопептидов в качестве эталона в спектрах ЯМР ^1H применяют, как правило, 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия или 3-(триметилсилил) пропионат натрия [8]. В кислой среде эти соединения переходят в соответствующие кислоты, плохо растворимые в D_2O . В связи с этим европейская фармакопея рекомендует использовать в качестве эталона для калибровки шкалы δ присутствующий в образцах олигопептидов ацетат-анион, приравнивая его химический сдвиг в спектре исследуемого образца к химическому сдвигу в спектре стандартного образца, снятому в аналогичных условиях [8]. На наш взгляд, в отсутствие стандартного образца использование ацетат-аниона для калибровки шкалы δ не совсем корректно, так как величина его химического сдвига в ассоциате олигопептид — уксусная кислота сильно зависит от степени диссоциации кислого протона, кото-

рая, в свою очередь, определяется эффективностью невалентных взаимодействий между компонентами ассоциата. Например, в соответствии с нашими экспериментальными данными (растворы олигопептидов в DMSO-d_6 , калибровка под остаточный недеирированный растворитель) δ метильной группы ацетат-аниона в БА и десмопрессина ацетате составляют 1,83 и 1,71 м.д. (^1H); 22,40 и 24,76 (^{13}C), соответственно. В фармакопейном анализе для калибровки спектров водных растворов часто используют 1,4-диоксан, поэтому данное соединение было выбрано нами в качестве эталонного ($\delta=3,75$ (^1H), 67,19 м.д. (^{13}C) [11]).

^1H и ^{13}C спектры БА в D_2O и DMSO-d_6 представлены на рис. 2 и 3, соответственно. Структурную интерпретацию спектральных данных осуществляли по следующему алгоритму:

- соотнесение сигналов спектров ^1H и ^{13}C с конкретными углеводородными фрагментами (метильными, метиленовыми, метиновыми группами) на основе данных ^1H - ^{13}C gHSQC эксперимента;
- определение соседних водородсодержащих фрагментов, связанных ковалентной связью, и составление из них последовательности в цикле или алифатической цепочке на основе данных ^1H - ^1H gCOSY;
- объединение в конкретную аминокислоту углеводородных фрагментов (алифатических и ароматических) и амидных групп на основе данных ^1H - ^{13}C gHMBC эксперимента;
- Установление аминокислотной последовательности на основе данных ^1H - ^{13}C gHMBC эксперимента по наличию кросс-пиков между сигналами $\alpha\text{-CH}$ и C=O групп соседних аминокислот.

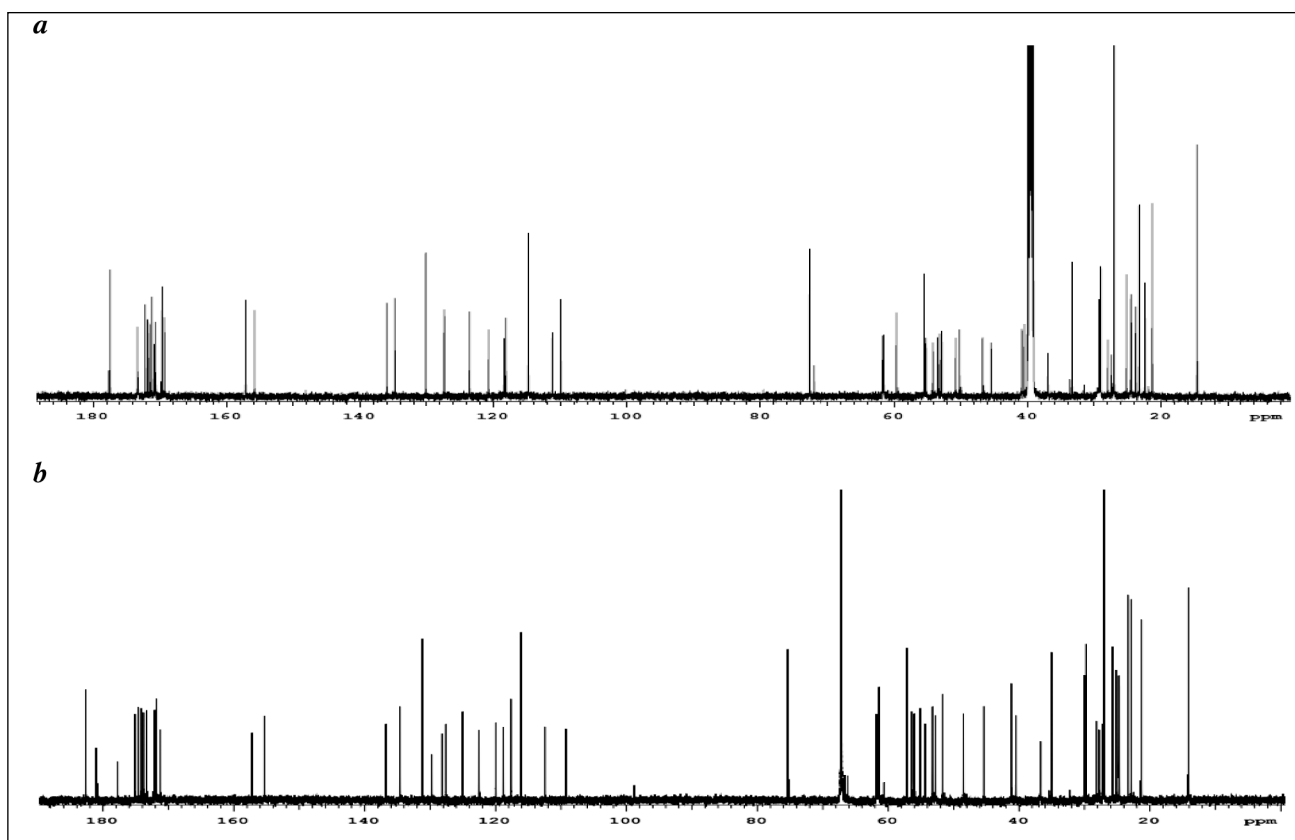


Рис. 3. Спектры ^{13}C растворов бусерелина ацетата в D_2O (a) и DMSO-d_6 (b)

Проведённая структурная интерпретация представлена в табл. 2, нумерация атомов — на рис. 4. Следует отметить, что в спектрах ^1H наблюдается частичное или полное перекрывание ряда сигналов. Например, в спектре раствора в DMSO-d_6 перекрываются сигналы амидных протонов L-Arg, L-Trp и L-Leu ($\delta=8,14\div 8,11$ м.д.); протонов $\alpha\text{-CH}$ групп L-Ser, L-Leu, O-tBu-Ser ($\delta=4,34\div 4,32$ м.д.); L-His и L-Arg ($\delta=4,45\div 4,43$

м.д.); протонов $\beta\text{-CH}_2$ групп 5-оксо-L-Pro, L-Arg, L-Pro ($\delta=1,75\div 1,72$ м.д.) и т.д. Спектр ^1H в D_2O не содержит сигналы амидных и гидроксильных протонов. В нём перекрываются сигналы ароматических протонов L-His и L-Trp ($\delta=7,13\div 7,12$ м.д.); протонов $\alpha\text{-CH}$ групп L-Trp и L-Leu ($\delta=4,38\div 4,37$ м.д.), 5-оксо-L-Pro и L-Pro ($\delta=4,22\div 4,19$ м.д.); протонов $\beta\text{-CH}_2$ групп 5-оксо-L-Pro, L-Arg, L-Arg ($\delta=1,64\div 1,66$ м.д.) и т.д. В

Таблица 2. Спектральные характеристики БА в D_2O (калибровка под 1,4-диоксан) и в DMSO-d_6 (калибровка под DMSO)

№ атома	$\text{D}_2\text{O}+10$ мкл 1,4-диоксана		DMSO-d_6	
	^1H , δ , м.д.; J, Гц	^{13}C , δ , м.д.	^1H , δ , м.д.; J, Гц	^{13}C , δ , м.д.
5-оксо-L-Пролин				
1		175,14		172,18
2	4,19 дд (J=8,5; 5,3)	57,16	3,97 дд (J=4,0; 8,6)	55,47
3	1,66 м; 2,36 м	25,69	1,75; 2,15	25,15
4	2,27 м; 2,33 м	29,75	2,17 м; 2,23 м	29,04
5		182,65		177,44
2-NH			7,75 с	
L-Гистидин				
6		171,99		170,83
7	4,64 дд (J=8,3; 6,5)	53,22	4,43 м	52,85
8	3,04 дд (J=15,3; 8,3) 3,14 дд (J=15,3; 6,5)	27,28	2,79 (J=15,3; 8,3); 2,89 (J=15,3; 6,5)	29,52
9		129,79		н/н*
10	8,37 с	134,63	7,49 с	134,77
	7,13 с	117,66	6,76	н/н
7-NH			7,98 д (J=7,6)	
9-NH			8,34	

Продолжение табл. 2.

№ атома	D ₂ O+10 мкл 1,4-диоксана		ДМСО-d ₆	
	¹ H, δ, м.д.; J, Гц	¹³ C, δ, м.д.	¹ H, δ, м.д.; J, Гц	¹³ C δ, м.д.
L-Триптофан				
12		173,85		171,51
13	4,69 дд (J=7,2; 6,6)	55,11	4,57 м	53,46
14	3,19 м; 3,23 м	27,79	2,97 м; 3,18 м	27,43
15		109,26		109,92
16		127,61		127,36
17	7,57 д (J=7,9)	118,83	7,57 д (J=7,9)	118,40
18	7,12 дд (J=7,9; 7,2)	119,97	6,93 дд (J=7,9; 7,2)	118,14
19	7,23 дд (J=8,2; 7,2)	122,56	7,03 дд (J=8,2; 7,2)	120,74
20	7,48 д (J=8,2)	112,47	7,30 д (J=8,2)	111,17
21		136,77		136,00
22	7,18 с	125,04	7,12 с	123,61
13-NH			8,14 д (J=8,0)	
21-NH			10,79 с	
L-Серин				
23		171,26		169,64
24	4,33 дд (J=5,8; 5,0)	56,03	4,32 м	55,21
25	3,69 дд (J=11,7; 5,0) 3,71 дд (J=11,7; 5,8)	61,80	3,52 м; 3,57 м	61,55
24-NH			8,39 д (J=6,7)	
25-OH			5,15 уш. с.	
L-Тирозин				
26		173,36		170,83
27	4,37 м	56,45	4,53 м	54,16
28	2,88 дд (J=13,6; 9,0) 2,96 дд (J=13,6; 6,9)	36,73	2,74 м; 2,87 м	36,93
29		128,17		127,41
30,34	7,07 д (J=8,5)	131,19	7,01 д (J=8,5)	130,18
31,33	6,83 д (J=8,5)	116,12	6,61 д (J=8,5)	114,78
32		155,31		155,82
27-NH			7,91 д (J=7,7)	
32-OH			8,81 уш.с.	
D-Серин-O-tert-Bu				
35		172,11		169,30
36	4,30 дд (J=5,5; 4,5)	54,37	4,34 м	53,15
37	3,22 м; 3,50 м	61,56	3,28	61,70
38		75,39		72,65
39-41	1,10 с	26,99	1,07 с	27,03
36-NH			8,03 д (J=7,6)	
L-Лейцин				
42		174,63		171,82
43	4,38 м	52,79	4,33 м	50,76
44	1,56 м; 1,64 м	40,48	1,40; 1,46	40,84
45	1,55 м	24,75	1,66 м	23,79
46	0,85 д (J=6,1)	21,32	0,82 д (J=6,1)	21,32
47	0,90 д (J=6,1)	22,86	0,85 д (J=6,1)	23,25
43-NH			8,11 д (J=6,5)	
L-Аргинин				
48		171,85		170,68
49	4,46 дд (J=8,2; 5,7)	51,70	4,45 м	50,18
50	1,64 м; 1,77 м	28,18	1,54 м; 1,72 м	27,97
51	1,54 м	24,68	1,54 м	24,45
52	3,11 м	41,19	3,06 м	40,48
53		157,23		157,12
49-NH			8,13 д (J=7,1)	
53-NH2			7,45 уш. с.	
L-Пролин-N-этилаид				
54		174,15		171,18
55	4,22 дд (J=8,1; 6,5)	61,42	4,20 дд (J=8,1; 6,5)	59,64
56	1,84 м; 2,18 м	30,04	1,73 м; 2,00 м	29,26
57	1,88 м; 1,98 м	25,19	1,81 м; 1,90 м	24,50
58	3,50 м; 3,65 м	48,50	3,54 м; 3,65 м	46,73
59	3,17 м	35,04	3,00 м; 3,07 м	33,20
60	1,06 т (J=7,3)	14,10	0,97 т (J=7,3)	13,10
Уксусная кислота				
1a	1,94 с	23,38	1,83 с	22,40
2a		181,14		173,35

Примечание. *н/н — сигнал не наблюдается

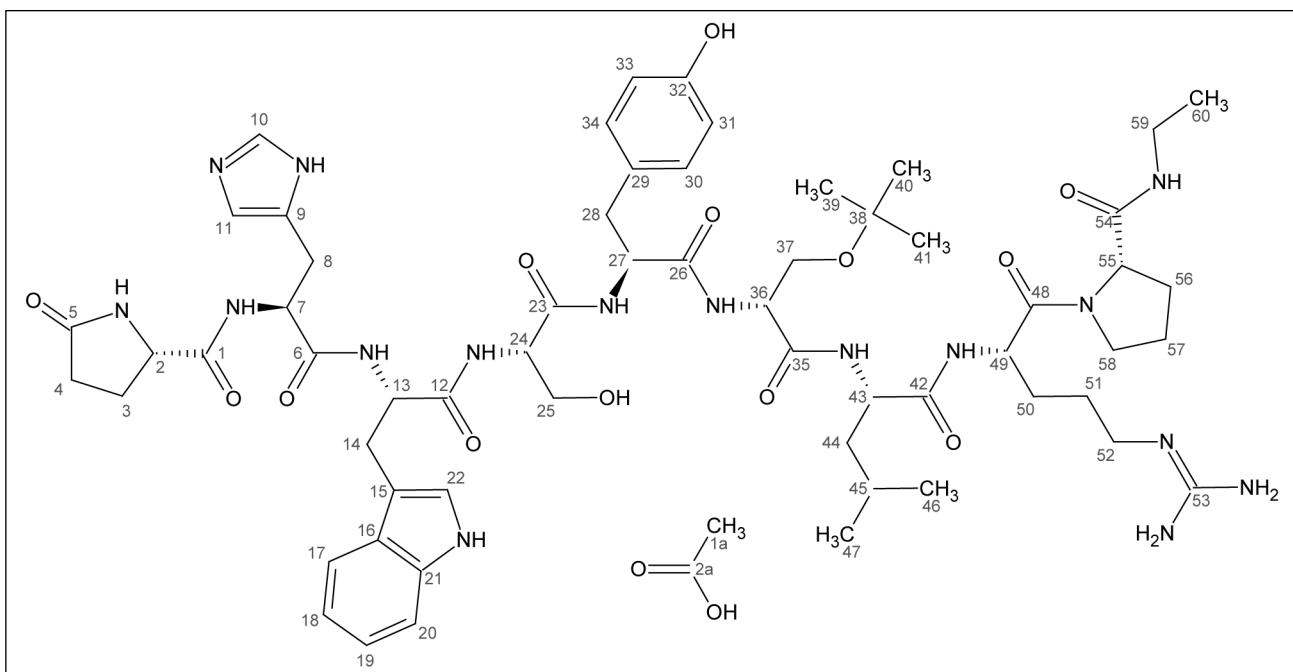


Рис. 4. Нумерация структурных фрагментов в молекуле БА

спектрах ^{13}C сигналы практически не перекрываются, что делает их более удобными для идентификации БА.

Характерной особенностью спектра ^{13}C БА в ДМСО- d_6 является отсутствие сигналов C(9) и CH(11) имидазольного фрагмента L-His, в то время как в спектре водного образца все его сигналы наблюдаются. По-видимому, данное явление связано с различной скоростью прототропной таутомерии замещённого имидазола в этих растворителях. Известно, что обменные прототропные превращения в азолах, чрезвычайно быстрые во временной шкале ЯМР в обычных средах, замедляются растворителями с ярко выраженными протонодонорными или протоноакцепторными свойствами [12]. Можно предположить, что из-за замедления протонного обмена под действием ДМСО в 4-замещённом имидазоле происходит усиление неэквивалентности электронного окружения углеродных ядер в позициях 4 и 5 имидазольного цикла и, как следствие, уширение соответствующих сигналов до критического соотношения S/N (их видимое отсутствие). Повышение температуры с 25 до 50°C не приводит к появлению отсутствующих сигналов. Аналогичная картина наблюдается в спектрах ^{13}C растворов в

ДМСО- d_6 родственных олигопептидов (дезоксибусерелина ацетата, [5-D-тирозин]-бусерелина ацетата, трипторелина ацетата).

Проведённая на основе комплексного анализа структурная интерпретация спектральных данных испытуемого образца БА однозначно доказывает его аминокислотный состав и аминокислотную последовательность. Это позволит в дальнейшем использовать его в качестве рабочего СО при решении задачи подтверждения подлинности. При этом достаточно ограничиваться регистрацией исключительно одномерных спектров (^1H или ^{13}C).

Таким образом, разработаны различные варианты методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции БА методом ЯМР спектроскопии без использования ФСО (на ядрах ^1H и ^{13}C , в растворителях D_2O и ДМСО- d_6). Планируемая в дальнейшем оценка специфичности каждого варианта методики путём сравнения спектральных данных бусерелина ацетата и его диастереомера ([5-D-тирозил]-бусерелина) позволит выбрать наиболее селективный вариант, обеспечивающий максимальное разделение сигналов основного компонента и родственных примесей в субстанции БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mezo I., Lovac S., Palyi I., Vincze B., Kalnay A., Turi G. et al. Synthesis of Gonadotropin-Releasing Hormone III Analogs. Structure-Antitumor Activity Relationships. *J Med Chem* 1997; 40 (21): 3353–3358.
2. Хасханова Л.Х., Пиддубный М.И., Ордианц И.М., Плаксина Н.Д., Погасов А.Г., Золичев Г.Е. и др. Вестник РУДН, сер. Медицина. Акушерство и гинекология 2002; 1: 225–227. / *Khaskhanova L.Kh., Piddubnyj M.I., Ordijanc I.M., Plaksina N.D., Pogasov A.G., Zolichev G.E. i dr. Vestnik RUDN, ser. Medicina. Akusherstvo i ginekologija* 2002; 1: 225–227. [in Russian]
3. Сафронова Е.Ю., Крашенинников А.А., Сергиенко С.А., Костин А.А. Использование современных аналогов лютенизирующего гормона рилизинг-гормона при проведении гормональной терапии у больных раком предстательной железы. Исследования и практика в медицине 2017; 4 (2): 23–28. / *Safronova E.Ju., Krashennnikov A.A., Sergienko S.A., Kostin A.A. Ispol'zovanie sovremennykh analogov luteinizirujushhego gormona rilizing-gormona pri provedenii gormonal'noj terapii u bol'nykh rakom predstatel'noj zhelezy. Issledovaniya i praktika v medicine* 2017; 4 (2): 23–28. [in Russian]

4. Monograph 01/2017:1077 Buserelin. in: European Pharmacopoeia, 9th ed. V.I. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines & Health Care; 2016. p. 1887—1889.
5. General monograph 5.12 Reference standards. in: European Pharmacopoeia, 9th ed. V.I. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines & Health Care; 2016. p. 733—738.
6. Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Яшикур В.А., Осинцева Е.В. Возможности использования метода ядерного магнитного резонанса при аттестации стандартных образцов. Стандартные образцы 2014; 2: 19—25. / *Kuz'mina N.E., Moiseev S.V., Jashkir V.A., Osinceva E.V. Vozmozhnosti ispol'zovaniya metoda jadernogo magnitnogo rezonansa pri attestacii standartnykh obrazcov. Standartnye obrazcy 2014; 2: 19—25. [in Russian]*
7. Лутцева А.И., Боквицкая Т.Н., Яшикур В.А., Стрнова Л.А., Кузьмина Н.Е., Агапкина М.В. и др. Методологические подходы к выбору методов установления подлинности лекарственных средств. Вестник НЦЭСМП 2017; 7 (2): 71—76. / *Lutceva A.I., Bokovikova T.N., Jashkir V.A., Stronova L.A., Kuz'mina N.E., Agapkina M.V. i dr. Metodologicheskie podkhody k vyboru metodov ustanovleniya podlinnosti lekarstvennykh sredstv. Vedomosti NC JeSMP 2017; 7 (2): 71—76. [in Russian]*
8. General monograph 2.2.64 Peptide identification by nuclear magnetic resonance. in: European Pharmacopoeia, 9th ed. V.I. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines & Health Care; 2016; 112.
9. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик в ГФ РФ, XIII изд. Т. 1. Москва: Изд-во Министерства здравоохранения РФ; 2015; 222-234.
10. Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Яшикур В.А., Меркулов В.А. Возможности метода ЯМР спектроскопии при определении микрокомпонентов смесей. Журнал аналитической химии 2014; 69 (11): 1152—1160. / *Kuz'mina N.E., Moiseev S.V., Krylov V.I., Jashkir V.A., Merkulov V.A. Vozmozhnosti metoda JaMR spektroskopii pri opredelenii mikrokomponentov smesey. Zhurnal analiticheskoy khimii 2014; 69 (11): 1152—1160. [in Russian]*
11. Gottlieb H.E., Kotlyar V., Nudelman A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. J Org Chem 1997; 62 (21): 7512—7515.
12. Ларина Л.И. Спектроскопия ЯМР и строение замещенных азолов. Автореферат дис. док. хим. наук. Иркутск: Иркутский гос. ун-в. 2003. / *Larina L.I. Spektroskopija JaMR i stroenie zameshennykh azolov. Avtoreferat dis. dok. khim. nauk. Irkutsk: Irkutskij gos. univ. 2003. [in Russian]*

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузьмина Наталья Евгеньевна — д.х.н., главный эксперт лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Моисеев Сергей Владимирович — к.х.н., доцент, ведущий эксперт лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Крылов Владислав Игоревич — ведущий инженер лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Яшикур Вадим Анатольевич — к.х.н., доцент, начальник лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Меркулов Вадим Анатольевич — д.м.н., профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Клиническое значение экспрессии топоизомеразы 2 α при раке молочной железы

*А. А. САМУСЕВА, Р. В. ЛЮБОТА, А. С. ЗОТОВ, Р. И. ВЕРЕЩАКО

Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, Украина

Clinical Significance of Expression of Topoisomerase 2 α in Breast Cancer

*A. A. SAMUSEVA, R. V. LYUBOTA, A. S. ZOTOV, R. I. VERESHCHAKO

Bogomolets National Medical University, Kiev, Ukraine

Топоизомеразы представляют собой ферменты, контролирующие топологию ДНК. Топоизомеразы разделяются на 1 и 2 типы, в зависимости от механизма действия. В статье обсуждается структура и механизмы действия топоизомераз, возможность самостоятельного значения уровня экспрессии топоизомеразы 2 α при проведении химиотерапии антрациклиновыми антибиотиками, которые ингибируют этот белок, у пациенток с раком молочной железы (РМЖ).

Ключевые слова: рак молочной железы, топоизомераза 2 α , антрациклиновые антибиотики.

Topoisomerases are enzymes that control the topology of DNA. Topoisomerases are divided into types 1 and 2, depending on the mechanism of action. The article discusses the structure and mechanisms of the action of topoisomerases, the possibility of an independent value of the level of expression of topoisomerase 2 α in the course of chemotherapy with anthracycline antibiotics that inhibit this protein in patients with breast cancer.

Keywords: breast cancer, topoisomerase 2 α , anthracycline antibiotics.

Введение

Рак молочной железы является гетерогенным заболеванием, прогноз, течение и тактика лечения которого зависит от морфологических и молекулярных особенностей строения клеток опухоли. Системная противоопухолевая терапия играет одну из ключевых ролей в лечении больных РМЖ. Располагая широким спектром цитостатиков, определение тактики наиболее эффективной медикаментозной терапии больных РМЖ в повседневной клинической практике с использованием стандартных факторов прогноза течения заболевания является сложной задачей. В ряде случаев у пациентов с одинаковыми клиническими, морфологическими и молекулярными характеристиками РМЖ эффективность применения одной и той же программы лекарственной терапии различна, что указывает на несовершенство стандартных прогностических факторов, используемых в рутинной клинической практике [1]. Все это диктует необходимость более полного исследования строения опухолей и внедрение в повседневную клиническую практику наиболее информативных маркеров, определяющих эффективность назначения определенных цитостати-

ков для персонификации тактики медикаментозной терапии больных РМЖ.

Большинство программ химиотерапии включают хотя бы один цитостатик, действие которого направлено на повреждение молекул ДНК, а процессы репарации поврежденной химиотерапией ДНК определяют жизнеспособность и пролиферативную активность клеток злокачественных опухолей. Таким образом, одним из перспективных направлений в определении факторов, которые влияют на эффективность химиотерапии, являются исследования нарушений в системе репарации ДНК. Структурные и функциональные нарушения ферментов, принимающих участие в процессах репарации ДНК, играют важную роль в опухолевой прогрессии, что делает их потенциальными факторами, определяющими чувствительность опухолевых клеток к медикаментозной и лучевой терапии. Ключевая роль в процессах репарации ДНК принадлежит топоизомеразам [2]. Топоизомеразы — группа ядерных ферментов, которые катализируют топологические изменения кольцевой молекулы ДНК путём создания временного однострессового или двустрессового разрыва в молекуле ДНК. Ингибиторы топоизомераз имеют большое клиническое значение, так как блокирование этих ферментов приводит к остановке клеточного цикла и инициации апоптоза [3].

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: 01601 Украина, Киев, б-р Тараса Шевченко, 13. Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца

Самыми популярными методами диагностики топоизомераз являются иммуногистохимический (ИГХ) и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). ИГХ — метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с мечеными антителами. FISH — молекулярно-цитогенетический метод, который применяют для детекции наличия или отсутствия последовательностей ДНК на хромосоме. При этом методе опухолевый срез фиксируют на позитивно заряженном предметном стекле. Препараты подвергаются депарафинизации и денатурируются, затем применяются специальные микролиты для гибридизации, в конце промываются специальным раствором. Препараты визуализируются с использованием специальных фильтров [4].

Это расширяет возможности персонализированного подхода и позволяет подобрать наиболее эффективную системную терапию для конкретного пациента, основываясь на уровне экспрессии топоизомераз опухолевыми клетками. Целью этой работы является обзор современных представлений о клиническом значении экспрессии топоизомераз клетками РМЖ.

Механизмы действия

По механизму действия топоизомеразы делятся на два типа. Топоизомераза, относящаяся к типу 1, впервые была описана James C. Wang в 1971 г. и первоначально названа им протеин ω [5]. В ходе своей работы топоизомеразы типа 1 вносят разрыв лишь в одну из цепей двойной спирали без затрат энергии. Топоизомеразы типа 2 разрывают одновременно обе нити двойной спирали ДНК и проводят сквозь разрыв другой двунитевой сегмент, что требует затрат аденозинтрифосфата.

Внесение одноцепочечных разрывов происходит за счёт остатка аминокислоты тирозина, который осуществляет нуклеофильную атаку фосфатной группы ДНК, образуя фосфотирозин. Сам фермент при этом связывается с высвободившимся 3'- или 5'-фосфатом. В зависимости от того, к какому фосфату присоединяется топоизомераза, выделяют:

- Топоизомеразы 1 α типа — связывающиеся с 5'-фосфатом; снимают только отрицательную суперспирализацию;
- Топоизомеразы 1 β типа — связывающиеся с 3'-фосфатом; снимают как положительную, так и отрицательную сверхспирализацию (явление пере- или недоскручивания топологически замкнутых цепей ДНК, в результате которого ось двойной спирали ДНК сама закручивается в спираль более высокого порядка. Под «топологически замкнутыми» понимают молекулы, свободное вращение концов которых затруднено).

Внесение двуцепочечных разрывов происходит за счёт связывания тирозинов топоизомеразы с ДНК с образованием двух 5'-фосфодиэфирных связей. Топоизомеразы 2 типа также разделяются на α и β типы. Несмотря на аналогичные структурные особенности и биологические свойства, эти две изоформы дифференциально регулируются и участвуют в различных клеточных процессах. Топоизомеразы 2 α типа необходимы для роста клеток, как правило, высокая экспрессия топоизомеразы 2 α наблюдается в быстрорастущих раковых клетках. Экспрессия топоизомераз 2 α регулируется клеточным циклом и достигает пика в G2/M. Экспрессия топоизомеразы 2 β происходит в клетках, находящихся в состоянии покоя практически всех тканей, в течение всего клеточного цикла и не является необходимой для выживания клеток [6].

Одним из основных механизмов действия химиопрепаратов является индукция повреждений ДНК с последующей гибелью клеток вследствие невозможности их репарации [7]. Ингибиторы топоизомеразы действуют по механизмам пост-репликативной репарации, которая осуществляется путём рекомбинации между двумя вновь образованными двойными спиралями ДНК. В таблице приведены основные ингибиторы топоизомеразы, которые используются для лечения злокачественных опухолей [8, 9].

К ингибиторам топоизомеразы 1 типа относятся камптотecin и его синтетические аналоги иринотекан и топотекан (а также белотекан, рубитекан, экзатекан, гиматекан, пегамотекан, луртотекан, каренитецин, афелетекан, гомокамптотecin, дифломотекан и др., проходят клинические испытания), блокирующие репликацию ДНК посредством блокады соответствующего фермента.

Примером ингибитора топоизомеразы 2 типа служит этопозид, противоопухолевая активность которого также обусловлена рядом других механизмов: индукцией образования свободных радикалов, дополнительно вызывающих повреждение ДНК, подавлением включения тимидина в ДНК, блокадой клеточного цикла в фазах S-G2 и др.

В исследовании G. M. Heestand, M. Schwaederle, Z. Gatalica et al., 2017 г. [10] была проанализирована экспрессия топоизомеразы 1 в опухолях 24262 больных со злокачественными опухолями различной локализации. Высокий уровень экспрессии топоизомеразы 1 выявлен в 51% опухолей. Частота выявления экспрессии топоизомеразы 1 зависела от типа опухоли и была наиболее высокой (>60%) у пациентов с мелкоклеточным раком лёгких, раком пищевода, тимуса, желудка, ануса, РМЖ, раком предстательной железы и т. д. Амплификация топоизомеразы 2 α выявлена только в 4% исследуемых опухолей, из них 17% случаев рака желчного пузыря и 5% слу-

Игбиторы топоизомераз с противоопухолевой активностью

Название	Механизм действия	Применение
Топотекан	Топоизомераза 1	Мелкоклеточный рак лёгкого, рак яичников
Лурмотекан		
Иринотекан		Колоректальный рак
Дифломотекан		Мелкоклеточный рак лёгкого, распространённый метастатический рак различных локализаций
Гиматекан		Метастатический рак различных локализаций
Эдотекан		Рак желудка, рак молочной железы
Этопозид	Топоизомераза 2	Рак яичка, хорионэпителиома, мелкоклеточный и немелкоклеточный рак лёгкого, рак яичников, неходжкинская лимфома, лимфогранулематоз, рак желудка
Тенипозид		Лимфогранулематоз, ретикулосаркома, острый лейкоз, рак мочевого пузыря, нейробластома, мелкоклеточный и немелкоклеточный рак лёгкого, неходжкинская лимфома
Доксорубицин		Злокачественные опухоли различных локализаций
Даунорубицин		Острый лейкоз
Митоксантрон		Рак молочной железы, неходжкинская лимфома, острый лейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, рак яичников

чаев инвазивного РМЖ. У 4903 пациентов проводилось исследование одновременной амплификации топоизомеразы 2 α и HER2/neu (ErbB2, рецепторов к эпидермальному фактору роста 2 типа), из них у 2,6% была выявлена коамплификация. Из 202 пациентов с амплификацией топоизомеразы 2 α , которые были проанализированы на HER2/neu, 64% имели амплификацию HER-2 /neu, а среди 483 пациентов с амплификацией HER2/neu, у 27% выявлена амплификация топоизомеразы 2 α .

ДНК-топоизомеразы являются важными мишенями антибактериальных препаратов, так как ДНК-гираза, необходимая для выживания бактерий, в основном отсутствует у эукариотов и поэтому является идеальной лекарственной мишенью [11].

Противоопухолевые антибактериальные препараты — продукты жизнедеятельности грибов подавляют синтез нуклеиновых кислот, действуя на уровне ДНК-матрицы, а именно образуют ДНК комплексы, препятствующие продвижению ферментов вдоль ДНК-матрицы.

Наибольшее применение в клинике получили антрациклиновые антибиотики. Механизм их действия сводится к интеркаляции (способность встраиваться между двумя нитями молекулы ДНК, за счёт реакции с пуриновым и пиримидиновым основанием) и ковалентному связыванию ДНК, торможению топоизомеразы 2, формированию свободных радикалов [12].

Топоизомераза 2 α и РМЖ

Развитие молекулярной биологии позволило выявить многие особенности фенотипа, механизмы канцерогенеза РМЖ. В прогностическом плане значимое место занимает определение уровня пролиферативной активности опухоли. Одним из маркеров пролиферации клеток РМЖ является топоизомераза 2 α . Антрациклины широко применяются в лечении РМЖ. Для антрациклинов, топоизомераза 2 α является молекулой-мишенью.

Ген топоизомеразы 2 α расположен близко к гену, кодирующему HER-2/neu на хромосоме 17q12-21. Амплификация HER-2/neu связана с абберацией топоизомеразы 2 α гена, что затрудняет представление о том, какой ген наиболее тесно связан с чувствительностью к антрациклинам. Предполагается, что нарушения в гене HER-2/neu вызывают амплификацию гена топоизомеразы 2 α по механизму breakage-fusion-bridge (механизм хромосомной нестабильности). Кроме того, амплификация гена топоизомеразы 2 α не всегда означает его экспрессию, но амплификация гена HER-2/neu сопровождается его экспрессией практически всегда [13].

А. Di Leo и соавт. (2011) провели анализ экспрессии топоизомеразы 2 α у 4558 больных РМЖ, которые принимали участие в 5 исследованиях. Авторы выявили экспрессию топоизомеразы 2 α в 61—89% исследуемых опухолей, а также определили, что наличие этого фермента в клетках опухоли является предиктором эффективности антрациклиновых антибиотиков в качестве адъювантной терапии больных РМЖ [14].

В исследовании А. Romero, М. Martin, М. С. U. Cheang et al. [15] была обнаружена более высокая экспрессия топоизомеразы 2 α в таких молекулярных типах РМЖ, как basal-like тип (ER-, PR-, HER-2 / neu-, CK5 / CK14+), luminal B (ER+ и / или PR+, HER2/neu+) и Her2+ type (ER-, PR-, HER-2 / neu+), в сравнении с luminal A (ER+ и / или PR+, HER2 / neu-), normal-like (ER-, PR-, HER-2 / neu-, CK5 / CK14-) и claudin-low (ER-, PR-, HER2/ neu-, низкий уровень ERBB2, ESR1 и белков межклеточной адгезии (claudin 3, 4, 7 и E-кадгерин) типами.

В работе P. L. Depowski, S. I. Rothental, T. P. Brien et al. [16] оценивали экспрессию топоизомеразы 2 α у больных с ранним РМЖ. Была обнаружена статистически значимая связь между повышенной экспрессией топоизомеразы 2 α и плохим прогнозом течения РМЖ, что показывает потенциальную роль топоизомеразы 2 α как прогностического фактора.

Примечательными являются результаты работы Е. В. Арутюняна, А. А. Бриллиант, Е. А. Новиковой и др. [17], в которой все случаи РМЖ были разделены на 2 группы. Экспрессия топоизомеразы 2 α оценивалась по шкале, предложенной L. Usha (гиперэкспрессия >35%). В группу 1 вошли случаи с нормальным уровнем экспрессии топоизомеразы 2 α (экспрессия на 1—35% опухолевых клеток). В группу 2 вошли случаи с повышенным уровнем экспрессии топоизомеразы 2 α (36—100%). В ходе анализа исходных данных было выявлено, что 78% образцов РМЖ имеют нормальную экспрессию рецепторов топоизомеразы 2 α ($n=453$), гиперэкспрессия рецепторов топоизомеразы 2 α ($n=79$) встречается в 14%. В 8% случаев ($n=46$) значение топоизомеразы практически не определялось. После проведения корреляционного анализа всех положительно экспрессирующих топоизомеразу 2 α (1—100%) случаев авторы отметили высокую силу положительной корреляции между топоизомеразой 2 α и Ki-67 ($r=0,76$), слабую отрицательную — с рецепторами эстрогена ($r=-0,29$) и прогестерона ($r=-0,25$), и очень слабую связь — с HER-2/neu ($r=0,06$).

Заключение

В лечении РМЖ применяется комплексный подход. Современные стандарты лечения РМЖ основываются на анализе молекулярных маркеров, основными из которых являются ER, PR, HER-2/neu и Ki-67, набор из этих четырёх маркеров позволяет определить фенотип опухоли. Однако, на определении этих маркеров возможности современной диагностики не ограничиваются. Для подбора более персонализированной такти-

ки лечения РМЖ, необходимым является поиск новых прогностически значимых маркёров, которые повлияли бы на лечение в виде повышения его эффективности.

Топоизомеразы — жизненно необходимые ферменты. Помимо необходимости изучить более подробно эти ферменты для улучшения понимания клеточных процессов также немаловажно более детальное понимание их роли в качестве целей антибактериальных агентов. Еще 40 лет назад было известно, что топоизомеразы являются мишенями для антибактериальных препаратов, однако до сих пор в мире открывают препараты, мишенями которых являются эти ферменты.

За последние годы учёные подбирают все более разнообразные методы для анализа структуры топоизомераз и процессов с их участием, в частности, такие как рентгеновская кристаллография [18], FRET (Förster resonance energy transfer) [19], кристаллография с временным разрешением [20] и др.

Ряд исследований показывают связь эффективности антрациклиновых схем с высоким уровнем экспрессии TOP 2 α [14, 21, 22]. Существуют исследования, показывающие противоположный результат [23].

Сделать однозначные выводы сложно в силу противоречивости данных различных исследований. Топоизомераза 2 α может быть важным прогностическим фактором у пациентов с РМЖ, полезным в прогнозировании ответа на химиотерапию на основе антрациклинов. С другой стороны, низкая распространённость амплификации топоизомеразы 2 α при РМЖ затрудняет оценку роли чувствительности этого маркёра к антрациклам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Щепотин И.Б., Зотов А.С., Любота Р.В., Аникусько Н.Ф., Любота И.И. Молекулярные типы рака грудной железы, определенные на основе иммуногистохимических маркеров: клинико-биологические особенности и прогноз течения. Клиническая онкология. — 2012. — Т. 4. — № 8. — С. 46—49. / *Hepotin I.B., Zotov A.S., Lyubota R.V., Anikus'ko N.F., Lyubota I.I. Molekulyarnye tipy raka grudnoj zhelezy, opredelennye na osnove immunogistokhimicheskikh markerov: kliniko-biologicheskie osobennosti i prognoz techeniya. Klinicheskaya onkologiya* 2012; 4 (8): 46—49. [in Russian]
2. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144: 646—674.
3. Branzei D., Foiani M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 208—219.
4. Badawy O.M., Loay I. FISH Analysis of TOP2A and HER-2 Aberrations in Female Breast Carcinoma on Archived Material: Egyptian NCI Experience. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017; 00: 1—7.
5. Wang J.C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω , *Journal of Molecular Biology* 1971; 55 (3): 523—533.
6. Woessner R.D., Mattern M.R., Mirabelli C.K. et al. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* 1991; 2: 209—214.
7. Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р. Нарушение системы репарации ДНК — роль в онкогенезе и терапии злокачественных новообразований. Казанский медицинский журнал. — 2014. — Т. XCV. — №3. — С.307—314. / *Boychuk S.V., Ramazanov B.R. Narushenie sistemy reparacii DNK — rol' v onkogeneze i terapii zlokachestvennykh novoobrazovaniy. Kazanskij medicinskij zhurnal* 2014; XCV (3): 307—314. [in Russian]
8. Xu Y., Her C. Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA damage repair and anticancer therapy. *Biomolecules* 2015; 5 (3): 1652—1670. doi: 10.3390/biom5031652.
9. Chen W., Qiu J., Shen Y.M. Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs. *Drug Discoveries Ther* 2012; 6: 230—237. —
10. Heestand G.M., Schwaederle M., Gatalica Z. et al. Topoisomerase expression and amplification in solid tumours: Analysis of 24,262 patients. *Eur J Cancer* 2017; 83: 80—87.
11. Bush N.G., Evans-Roberts K., Maxwell A. DNA Topoisomerases, *EcoSal Plus* 2015; 6 (2): 1—34.
12. *Переводчикова Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний* 2011. / *Perevodchikova N.I. Rukovodstvo po khimioterapii opukholevykh zabolevanij* 2011. [in Russian]
13. Faratian D., Bartlett J. Predictive markers in breast cancer — the future, *Histopathology* 2008; 52: 91—98.
14. Di Leo A., Desmedt C., Bartlett J.M., Piette F., Ejlersen B., Pritchard K.I. et al. Group HTAM-aS. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2011; 12 (12): 1134—1142.
15. Romero A., Martin M., Cheang M.C.U. et al. Assessment of Topoisomerase II α Status in Breast Cancer by Quantitative PCR, Gene Expression Microarrays, Immunohistochemistry, and Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Am J Pathol* 2011; 178 (4): 1453—1460.
16. Depowski P.L., Rothental S.I., Brien T.P. et al. Topoisomerase II Expression in Breast Cancer: Correlation with Outcome Variables. *Mod Pathol* 2000; 13 (5): 542—547.
17. Арутюнян Е.В., Бриллиант А.А., Новикова Е.А. и др. Некоторые закономерности экспрессии иммуногистохимических маркёров на клетках карциномы молочной железы. Уральский медицинский журнал. —

2014. — Т. 02. — №116. — С. 5—8. / *Arutyunyan E.V., Brilliant A.A., Novikova E.A. i dr.* Nekotorye zakonomernosti ehkspressii immunogistokhimicheskikh markyrov na kletkakh karcinomy molochnoj zhelezy, Ural'skij medicinskij zhurnal 2014; 02 (116): 5—8. [in Russian]
18. *Lewis R.J., Singh O.M.P., Smith C.V. et al.* The nature of inhibition of grease by the coumarins and the caclothialidines revealed by crystallography. The EMBO Journal 1996; 15 (6): 1412—1420.
 19. *Huang W., Lee C., Hsieh T.* Single-molecule FRET analysis discloses the dynamics of the DNA-topoisomerase II (TOP2) interaction in the presence of TOP2-targeting agents. J Biol Chem 2017; 292: 12589—12598.
 20. *Moffat K.* Timeresolved crystallography and protein design: signalling photoreceptors and optogenetics. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2014; 369 (1647): 20130568.
 21. *Казанцева П.В., Цыганов М.М., Слонимская Е.М. и др.* Молекулярно-генетические маркёры эффективности неoadъювантной химиотерапии применением антрациклинов у больных раком молочной железы. Сибирский онкологический журнал. — 2016. — Т. 15. — № 2. — С. 29—35. / *Kazanceva P.V., Cyganov M.M., Slonimskaya E.M. i dr.* Molekulyarno-geneticheskie markery ehffektivnosti neoad'yuvantnoj khimioterapii primeneniem antraciklinov u bol'nykh rakom molochnoj zhelezy. Sibirskij onkologicheskij zhurnal 2016; 15 (2): 29—35. [in Russian]
 22. *Durbecq V., Paesmans M., Cardoso F.* Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. Mol Cancer Ther 2004; 3 (10): 1207—1214.
 23. *Järvinen T.A., Holli K., Kuukasjärvi T. et al.* Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. Br J Cancer 1998; 77 (12): 2267—2273.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Самусева Анастасия Андреевна — старший лаборант кафедры онкологии НМУ им. А. А. Богомольца, Киев, Украина
Любота Роман Викторович — к. мед. н., ассистент кафедры онкологии НМУ им. А. А. Богомольца, Киев, Украина

Зотов Алексей Сергеевич — к. мед. н., доцент; доцент кафедры онкологии НМУ им. А. А. Богомольца, Киев, Украина
Верещако Роман Иванович — д. мед. н., доцент, заведующий кафедры онкологии НМУ им. А. А. Богомольца, Киев, Украина

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

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

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

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

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

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

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

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

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. На обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. **Подписи к рисункам делаются на отдельном листе с указанием номера рисунка и его названия.** Для графи-

ков и диаграмм отмечается, **что дано по осям координат** на приведенных кривых и т. п.

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

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

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

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

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

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

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

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

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

