

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 60



9–10'2015

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

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 2015

Типография:

ООО «Новелла»

Дата выхода: 30.11.2015

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 60

9—10'2015

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Член-корр РАМН, проф., д. м. н. Белоусов Ю. Б.
Проф., д. м. н. Белобородов В. А.
Проф. Говорун В. М.
Проф. Гомберг М. А.
Д. б. н. Даниленко В. Н.
Проф. 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. Бежавская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Клясова Г. А.
Бибикова М. В.	Ленёва И. А.
Васильев А. Н.	Митрохин С. Д.
Волжанин В. М.	Романцов М. Г.
Дмитриева Н. В.	Сычев Д. А.
Долгова Г. В.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Цыбанев А. А.
Зуева Л. П.	Ших Е. В.
Ильина Е. Н.	

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

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

Оригинальные статьи

Лапчинская О. А., Катруха Г. С., Терехова Л. П.,
Гладких Е. Г., Куляева В. В., Погожева В. В.,
Орлова Г. И., Тренин А. С., Федорова Г. Б.
Ирумацин, образуемый *Streptomyces roseoflavus*
ИНА-1278
Бычкова Е. Н., Королев А. М., Олсуфьева Е. Н.,
Мирчинк Е. П., Исакова Е. Б.
Получение и изучение новых карбоксамидов
антибиотиков эремомицина и ванкомицина
с 4- или 3-аминометилфенилборной кислотой
Голикова М. В., Струкова Е. Н.,
Портной Ю. А., Фирсов А. А.
Прогнозирование развития антибиотикорезистентности
бактерий методами фармакокинетико-
фармакодинамического моделирования: альтернативные
подходы к анализу экспериментальных данных

В помощь практикующему врачу

Лисицына Е. С., Черненко Т. В., Ильина Е. Н.,
Лазарева И. В., Агеев В. А., Сидоренко С. В.
Обнаружение генетических маркеров резистентности
к β -лактамам антибиотикам у грамотрицательных
микроорганизмов с помощью ПЦР-диагностики
Гостев В. В., Калиногорская О. С.,
Круглов А. Н., Сидоренко С. В.
Антибиотикорезистентность коагулазоотрицательных
стафилококков, выделенных в стационарах
Санкт-Петербурга и Москвы
Кантемирова Б. И., Галимзянов Х. М., Степанова Н. А.,
Чернышева А. Х., Алиева З. А.
Перспективы фармакогенетического тестирования для
разработки алгоритмов персонализированного лечения
туберкулеза органов дыхания в Астраханском регионе

Обзоры

Валеев В. В., Коваленко А. Л., Таликова Е. В.,
Зaplутанов В. А., Дельвиг-Каменская Т. Ю.
Биологические функции сукцината
(обзор зарубежных экспериментальных исследований)
Цыганов М. М., Родионов Е. О.,
Миллер С. В., Литвяков Н. В.
Обоснование использования экспрессионных маркеров
для персонализации химиотерапии рака лёгкого
Черникова Н. К., Бондарева Т. А., Борисевич С. В.,
Подкуйко В. Н., Хмелев А. Л., Дорохина Т. В.
Методы и средства купирования побочного действия
вируса вакцины при оспопрививании

По страницам журналов

Original Papers

- 3 Lapchinskaya O. A., Katrukha G. S., Terekhova L. P.,
Gladkikh E. G., Kulyaeva V. V., Pogozheva V. V.,
Orlova G. I., Trenin A. S., Fedorova G. B.
Irumamicin Produced by *Streptomyces roseoflavus*
INA-1278
- 7 Bychkova E. N., Korolev A. M., Olsufyeva E. N.,
Mirchink E. P., Isakova E. B.
Design of Novel Carboxamides of Eremomycin
and Vancomycin with 4- or 3-Amino Methyl
Phenyl Boric Acid and Their Investigation
- 12 Golikova M. V., Strukova E. N.,
Portnoy Y. A., Firsov A. A.
PK/PD Modeling as a Tool for Predicting
Bacterial Resistance to Antibiotics: Alternative
Analyses of Experimental Data

Guidelines For Practitioners

- 17 Lisitsina E. S., Chernenkaya T. V., Ilyina E. N.,
Lazareva I. V., Ageevets V. A., Sidorenko S. V.
Discovery of Genetic Markers of Resistance
to β -Lactams in Gramnegative Microorganisms
by PCR Diagnosis
- 23 Gostev V. V., Kalinogorskaya O. S.,
Kruglov A. N., Sidorenko S. V.
Antibiotic Resistance of Coagulase-Negative
Staphylococci Isolated at Hospitals
of St. Petersburg and Moscow
- 29 Kantemirova B. I., Galimzyanov Kh. M., Stepanova N. A.,
Chernysheva A. Kh., Alieva Z. A.
Prospects of Pharmacogenetic Testing for Design
of Algorithms for Personalized Treatment of Tuberculosis
of Respiratory Organs in the Astrakhan Region

Reviews

- 33 Valeev V. V., Kovalenko A. L., Talikova E. V.,
Zaplutanov V. A., Delvig-Kamenskaya T. Yu.
Biological Functions of Succinate
(a Review of Foreign Experimental Studies)
- 38 Tsyganov M. M., Rodionov E. O.,
Miller S. V., Litvyakov N. V.
Substantiation of Expressive Markers Use
to Personalize Lung Cancer Chemotherapy
- 46 Chernikova N. K., Bondareva T. A., Borisevich S. V.,
Podkujko V. N., Khmelyev A. L., Dorokhina T. V.
Methods and Means for Defense from Collateral Action
of Vaccine Virus after Vaccination Against Smallpox

Abstracts

* Журнал входит в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Ирумамицин, образуемый *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278

О. А. ЛАПЧИНСКАЯ, Г. С. КАТРУХА, Л. П. ТЕРЕХОВА, Е. Г. ГЛАДКИХ, В. В. КУЛЯЕВА,
В. В. ПОГОЖЕВА, Г. И. ОРЛОВА, А. С. ТРЕНИН, Г. Б. ФЕДОРОВА

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

Irumamicin Produced by *Streptomyces roseoflavus* INA-1278

O. A. LAPCHINSKAYA, G. S. KATRUHA, L. P. TEREKHOVA, E. G. GLADKIKH, V. V. KULYAEVA,
V. V. POGOSHEVA, G. I. ORLOVA, A. S. TRENIN, G. B. FEDOROVA

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Представлено микробиологическое описание штамма *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278 — нового продуцента макролидного противогрибкового антибиотика ирумамицина. Ирумамицин 1278, образуемый новым продуцентом, по противогрибковой активности отличается от ирумамицина, образуемого известным мировым продуцентом *Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis* subsp. nov. AM-3603.

Ключевые слова: макролидный антибиотик, штамм-продуцент, противогрибковая активность.

The strain *Streptomyces roseoflavus* INA-1278 is described as a new irumamicin producer. Irumamicin 1278 is different by the antifungal activity from irumamicin produced by the world-known strain *Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis* subsp. nov. AM-3603.

Key words: macrolide, producer, antifungal activity.

Введение

Согласно программе систематического скрининга новых продуцентов среди актиномицетов как основного источника практически значимых биологически активных соединений и селекции на повышение биосинтетической активности почвенных культур, в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе был получен штамм *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278, образующий антибиотик с выраженной антифунгальной активностью *in vitro* [1].

На основании совокупности изученных методами масс-спектрометрии и спектроскопии ^1H , ^{13}C , ЯМР, MS, IR физико-химических свойств и при использовании базы данных природных биологически активных веществ (BNPD), разработанной Я. Берди (Венгрия), антибиотик ИНА-1278 был отнесен к 20-членным макролидам группы ирумамицина [2, 3] и практически оказался идентичен ирумамицину.

В настоящей статье представлены результаты микробиологического изучения штамма-продуцента *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278, а также данные по биосинтезу и анализу некоторых свойств ирумамицина 1278 в сравнении с проти-

вогрибковым антибиотиком ирумамицином, образуемым известным мировым продуцентом *Streptomyces roseoflavus*.

Материал и методы

Штамм-продуцент *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278 получен из почвенной культуры ступенчатой селекцией на повышение биосинтетической активности с применением N-метил-N¹-нитро-N-нитрозогуанидина с последующим высевом мутагенизированной популяции спор на агаровые среды, содержащие антибиотики (эритромицин, блеомицин, стрептомицин, фузидин) в качестве селективных агентов.

Микробиологическое изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамма ИНА-1278 проводили на диагностических средах, принятых в лабораторной практике для описания актиномицетов [4].

Биосинтез ирумамицина осуществляли при двухстадийной ферментации в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в 100 мл питательной среды на круговой качалке, 220 об/мин при 28°C.

Культуру продуцента выращивали на агаровой среде № 2 Гаузе при 37°C в течение 5–7 сут. Полученными агаровыми блоками 0,5 см² засевали колбы с посевной средой № 2 Гаузе (с бульоном Хоттингера). В колбы с ферментационной средой вносили 7–10% 48-часового посевного материала. Длительность культивирования составила 96–120 ч.

Содержание ирумамицина в ферментационной жидкости определяли после экстракции бутанолом (1:1) с использованием метода ТСХ на пластинках Kieselgel 60 «Merck» в системе органических растворителей гексан–ацетон (1:1) с биоавтографическим проявлением по тест-культуре *Aspergillus niger* INA 00760, инокулированной в агар № 2 Гаузе после 18 ч инкубирования при 37°C.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Б.Пироговская, д. 11, стр. 1. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе

Таблица 1. Культурально-морфологические признаки штамма ИНА-1278

Агаровая среда	Рост воздушного мицелия	Цвет мицелия		Растворимый пигмент
		воздушного	субстратного	
№ 1 Гаузе	+++	Серовато-белый до розоватого (Д-3, Р-2)	Бледно-буроватый (Б-4)	Слабый светло-желтый (Д-4)
Овсяная	++	Бледно-буроватый (Б-6)	Серовато-желтый (Д-3, Ж-1)	нет
Чапекка	+++	Беловатый (Д-3)	Буровато-желтоватый (Д-4)	нет
Глюкозо-аспарагиновая	+	Желтоватый (Ж-1)	Бледно-буроватый (Б-4)	нет
Линденбайна (глицерин-нитратная)	+++	Беловато-кремовый (Д-3, Сооб)	Желтовато-кремовый (Б-6)	нет
Красильникова СР-1		Нет роста		
№ 2 Гаузе	++	Беловато-розоватый (Д-3, Г-3)	Беловато-кремоватый (Д-3, Б-6)	нет
Треснера (с пептоном и лимоннокислым железом)		Меланоидные пигменты не образует		

Примечание. * / (+++) – хороший; (++) – умеренный; (+) – слабый.

Выделение и химическую очистку субстанции ирумамицина 1278 проводили по специально разработанной схеме многостадийного процесса экстракции и колоночной хроматографии, а также аналитических методов характеристики физико-химических свойств биосинтетического продукта, подробно описанных ранее [1].

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) (мкг/мл) в отношении различных микробных культур определяли добавлением полученного ирумамицина в убывающих концентрациях к среде № 2 Гаузе.

Использовались тест-культуры *Aspergillus niger* INA 00760, ки INA 00760, *Candida albicans* Ки INA 00763 — из шток-образцов коллекции НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Результаты и обсуждение

Микробиологическое описание штамма ИНА-1278 проводили на следующих диагностических средах: минеральном агаре № 1 Гаузе, органическом агаре № 2 Гаузе, глюкозо-аспарагиновом агаре и сахарозо-нитратном агаре (среда Чапека), глюкозо-нитратном агаре (среда Красильникова), глицерин-нитратном агаре (среда Линденбайна). На диагностических средах определяли цвет воздушного и субстратного мицелия, наличие растворимых пигментов — на среде Треснера с пептоном и лимоннокислым железом. Для оценки цветов мицелия использовали шкалы Бондарцева и Праузера. Споровый посевной материал 10-дневной культуры штамма, выращенной на глицерин-нитратной агаровой среде Линденбайна, высевали на скошенный агар; инкубировали при 28°C в течение 7—21 сут.

Штамм ИНА-1278 характеризуется следующими культурально-морфологическими признаками (табл. 1).

Морфологические признаки. Цепочки спор прямые, извилистые, поверхность спор гладкая.

Антагонистические свойства. При испытании методом штриха на агаре № 2 Гаузе штамм подав-

ляет рост грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов.

По культурально-морфологическим характеристикам штамм-продуцент ИНА-1278 соответствует типовой культуре *Streptomyces roseoflavus* Arai1951 (одобренный список, 1980), для которой известно образование флавомицина и ряда структурно связанных с ним аминогликозидных антибиотиков. Известным мировым продуцентом ирумамицина является таксономически другая культура актиномицета *S.subflavus* subsp. *Irumaensis* subsp. nov. AM-3603 [2].

Физиолого-биохимические свойства штамма ИНА-1278. Типичный аэроб. Растёт при (24—45)°С, оптимум роста 28°C и в диапазонах значений pH (5,0-10,0) с оптимумом роста при pH 7,0. Желатину разжижает. Молоко пептонизирует. Сахарозу инвертирует. Крахмал гидролизует. На клетчатке не растёт. Восстанавливает нитраты до нитритов. Меланоидные пигменты не образует при росте на среде Треснера с пептоном и лимоннокислым железом. Устойчив к NaCl (3,5 %) при росте на среде № 2 Гаузе.

Отношение к углеводам: хорошо использует фруктозу, мальтозу, рамнозу; умеренно глюкозу, арабинозу, лактозу, слабо использует сахарозу, сорбит, маннит, не использует раффинозу и целлюлозу при росте на средах с неорганическим источником азота.

Биосинтез ирумамицина: осуществлялся в жидкой питательной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода (%: глюкоза — 3,0; соевая мука 3,0; MgSO₄ — 0,4; NaCl — 0,5; CaCO₃ — 0,3) с максимальным накоплением антибиотика в мицелии продуцента к 96 ч ферментационного процесса при завершении роста культуры и сохраняющимся до 120 ч культивирования (pH 7,6—7,8).

Таблица 2. Физико-химические свойства ирумамина 1278 и антибиотика ирумамина

Свойства	Ирумамин 1278	Антибиотик ирумамин [2]
Брутто-формула (Мол. масса)	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₂ (763)	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₂ (763) C 65,7; H 8,54, N 1,95%
Мол. масса. Метод MALDI-TOF (m/z)	786,4 (M+Na) ⁺ 802,4 (M+K) ⁺	—
UV-VIS спектр (EtOH), λ _{max} , нм	232	232
ИК-спектр (KBr), ν _{max} , см ⁻¹	3456; 2968–2856; 1720; 1603; 1381; 1075; 973	3400; 2960–2920; 1700; 1590; 1330; 1073
[α] _D ²⁰	+40° (с 1,0, CHCl ₃)	+12° (с 1,0, CHCl ₃)
ТСХ (SiO ₂), R _f в системе:		
гексан–хлороформ–метанол (5:1:1)	0,3	0,4
этилацетат–гексан (1:1)	0,87	0,87
бензол–ацетон (1:1)	0,63	0,84
Качественная реакция:		
нингидрин	—	—
анисовый альдегид + H ₂ SO ₄	+	+
(NH ₄)SO ₄ + NH ₄ HSO ₄ + нагревание	+	+
Растворимость:		
легко растворим	Ацетон, этилацетат, низшие спирты, толуол, диэтиловый эфир	Ацетон, этилацетат, метанол, этанол, бензол, DMSO, диэтиловый эфир
нерастворим	Гексан, вода	Гексан, вода

Таблица 3. Сравнительная антимикробная активность ирумамина 1278 *in vitro*

Тест-микроорганизм	МПК, мкг/мл	
	ирумамин 1278	ирумамин [2]
<i>Candida albicans</i>		100
Ки INA 00763	4,2	
<i>Aspergillus niger</i>		100
INA 00760	0,2	
Ки INA 00760	0,3	
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	12,5	н/а

Ирумамин 1278, полученный из мицелия продуцента в виде хроматографически очищенного белого кристаллического порошка, по основным физико-химическим свойствам идентичен известному антибиотику ируамицину (табл. 2).

При этом существуют незначительные различия в хроматографическом поведении (значения R_f) в двух из трёх использованных системах растворителей (гексан–хлороформ–метанол; бензол–ацетон), а также в показателях угла вращения.

В противоположность этому, весьма существенны различия ируамицинов по противомикробной активности *in vitro* (табл. 3).

Превосходство ируамицина 1278 по противогрибковой активности выражается в более чем десятикратно меньших значениях МПК для *A.niger* и для *Candida albicans*. Отличительным признаком ируамицина 1278 является также наличие умеренной антибиотической активности в отношении грамположительной тест-культуры *B.subtilis*.

Полученные результаты указывают на целесообразность развития исследований по уточнению и детализации пространственной структуры ируамицина 1278, не выявленные возможные отличия которой определяют существенный сдвиг в биологической активности природного макролидного соединения, образуемого новым продуцентом. Одновременно с этим, обоснованно изучение его лечебных свойств *in vivo*, перспективность которых при грибковых инфекциях подтверждается

данными о сопоставимости *in vitro* противогрибкового эффекта ируамицина 1278 в отношении *A.niger* с амфотерицином В [6].

Ирумамин 1278, являясь типичным макролидным соединением, представляет также исследовательский интерес с точки зрения новых тест-моделей для обнаружения возможных фармакологических свойств, многообразие и медицинская значимость которых характерны для макролидных антибиотиков.

Заключение

Проведено микробиологическое описание культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамма *S.roseoflavus* ИНА-1278 — продуцента противогрибкового макролидного антибиотика ируамицина, известным продуцентом которого является культура актиномицета *S.subflavus*.

При идентичности химических структур ируамицинов, образуемых двумя таксономически различными актиномицетами, ирумамин нового продуцента существенно отличается по показателям противомикробной активности *in vitro*.

Полученные данные указывают на необходимость развития исследований по уточнению и детализации пространственной ориентации структуры ируамицина 1278 и по определению возможной медицинской значимости его противогрибкового эффекта *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shashkov A.C., Tsvetkov D.E., Lapchinskaya O.A., Kulyaeva V.V. et al. Structure, ^1H and ^{13}C NMR spectra, and biological activity of the antibiotic INA-1278 related to irumamicin and produced by the experimental *Streptomyces* sp. strain No. 1278. Chem Bull Int Ed 2011; 60: 11: 2412–2417.
2. Omura S., Tanaka Y., Takahashi Y. et al. Irumamicin, an antifungal 20-membered macrolide produced by *Streptomyces*. Taxonomy, fermentation and biological properties. J Antibiot 1984; 37:12: 1572–1578.
3. Omura S., Tanaka Y., Nakagawa A. et al. Irumamicin, a new antibiotic active against phytopathogenic fungi. J Antibiot 1982; 82: 2: 256–257.
4. Chirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol 1966; 16: 313–340.
5. Гаузе Г.Ф., Преображенская М.Н., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.:1984; Наука, 130. / Gauze G.F., Preobrazhenskaja M.N., Sveshnikova M.A., Terehova L.P., Maksimova T.S. Opredelitel' aktinomicetov. M.:1984; Nauka, 130. [in Russian]
6. Тренин А.С., Лапчинская О.А., Куляева В.В. и др. ИНА-1278 — антибиотик из группы ирумацинов, обладающий высокой противогрибковой активностью. Современная микология в России. Том 3. Материалы III Съезда микологов России. М.: 2012; 355. / Trenin A.S., Lapchinskaja O.A., Kuljaeva V.V. i dr. INA-1278 — antibiotik iz gruppy irumamicinov, obladajushhij vysokoj protivogribkovoju aktivnost'ju. Sovremennaja mikologija v Rossii. Tom 3. Materialy III S#ezda mikologov Rossii. M.: 2012; 355. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лапчинская О.А. — д. б. н., зав. лабораторией; НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Катруха Г.С. — д. х. н., профессор, сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Терехова Л.П. — д. б. н., профессор, зав. лабораторией, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Гладких Е.Г. — к. б. н., старший научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Куляева В.В. — к. б. н., старший научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Погожева В.В. — научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Орлова Г.И. — к. б. н., научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Тренин А.С. — д. б. н., руководитель сектора НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Федорова Г.Б. — к. б. н., старший научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Получение и изучение новых карбоксамидов антибиотиков эремомицина и ванкомицина с 4- или 3-аминометилфенилборной кислотой

Е. Н. БЫЧКОВА, А. М. КОРОЛЕВ, Е. Н. ОЛСУФЬЕВА, Е. П. МИРЧИНК, Е. Б. ИСАКОВА

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

Design of Novel Carboxamides of Eremomycin and Vancomycin with 4- or 3-Amino Methyl Phenyl Boric Acid and Their Investigation

E. N. BYCHKOVA, A. M. KOROLEV, E. N. OLSUFYEVA, E. P. MIRCHINK, E. B. ISAKOVA

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Амидированием концевой карбоксильной группы антибиотиков эремомицина и ванкомицина пинаколиновыми эфирами 4- или 3-аминометилфенилбороновыми кислотами в присутствии конденсирующего реагента PyBOP получены новые карбоксамиды этих антибиотиков (IIIa—VIa). Удаление пинаколиновой группы в мягких условиях гидролиза в слабокислой водной среде привело к соответствующим производным с остатком незащищённой борной кислоты (III—VI). Установлено, что активность 4-замещённых производных борол-содержащих антибиотиков эремомицина и ванкомицина практически равна активности исходных антибиотиков, но выше активности соответствующих 3-замещённых производных борол-содержащих производных в отношении 8 штаммов грамположительных бактерий.

Ключевые слова: эремомицин, ванкомицин, 4- или 3-аминометилфенилборная кислота, амидирование, антибактериальная активность, стафилококки, энтерококки.

Amidation of the end carboxyl group of eremomycin and vancomycin by pinacolinic 4- or 3-amino methyl phenyl boron acids esters in the presence of the condensing reagent PyBOP resulted in formation of novel carboxamides of the antibiotics (IIIa—VIa). After elimination of the pinacolinic group under mild hydrolysis in weak acid aqueous medium there formed the respective derivatives with a residue of the nonprotected boric acid (III—VI). It was shown that the activity of the 4-substituted derivatives of the borole-containing eremomycin and vancomycin practically was the same as that of the initial antibiotics, while higher than that of the respective 3-substituted derivatives of the borole-containing derivatives against 8 strains of grampositive bacteria.

Key words: eremomycin, vancomycin, 4- or 3-amino methyl phenyl boric acid, amidation, antibacterial activity, staphylococci, enterococci.

Введение

Одной из наиболее актуальных проблем современной антибактериальной терапии стала ежегодно растущая устойчивость болезнетворных бактерий к применяемым антибиотикам [1, 2]. Макроциклические гликопептидные антибиотики — ванкомицин и тейкопланин высокоактивны в отношении грамположительных бактерий и относятся к антибиотикам резерва, поскольку они эффективны при лечении инфекционных заболеваний, вызванных, прежде всего, широко распространенными метициллиноустойчивыми стафилококками (MRSA), на которые другие лекарственные средства не действуют. К гликопептидам долгое время не наблюдалось развития устойчивости бактерий.

Однако применение ванкомицина в клинической практике и авопарцина в сельском хозяйстве привело к возникновению штаммов стафилококков и энтерококков, устойчивых к действию гликопептидов (GISA и GRE) [3, 4].

Направленная модификация природных антибиотиков позволяет получать соединения с заданными свойствами: улучшать фармакологические свойства, расширять спектр антимикробного действия и преодолевать резистентность штаммов, устойчивых к данной группе антибиотиков. Усилиями учёных разных стран разрабатываются подходы к созданию нового поколения гликопептидов, преодолевающих резистентность опасных патогенов путём направленной химической модификации природных антибиотиков [3, 5, 6]: Три препарата из класса полусинтетических гликопептидов — оритаваксин, телаваксин и далбаваксин в настоящее время ограниченно разрешены к применению в клинике для лечения

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, д.11. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе

некоторых видов воспалительных процессов, вызванных чувствительными и резистентными видами грамположительных бактерий [2, 7, 8].

Одним из эффективных направлений создания новых лекарственных средств является синтез антибиотиков двойного действия («dual action drugs») — химерных (гетеродимерных) структур на основе антибактериальных препаратов разных классов [9]. Особый интерес для конъюгации с антибиотиками представляют производные борной кислоты. Такие соединения способны к взаимодействию с различными биологически важными элементами структуры живой клетки — спиртами, аминоспиртами, углеводами, РНК и некоторыми пептидами. Это свойство может лежать в основе биологической активности подобных производных. Присоединение фрагмента, содержащего остаток борной кислоты, к молекуле антибиотика может существенно изменить его химические и биологические свойства [10].

До последнего времени бор-содержащие производные не привлекали внимания медицинских химиков. В настоящее время препарат Бортезомид (Велкаде) — [(1R)-3-метил-1-((2S)-3-фенил-2-[(пирпазин-2-илкарбонил)амино]-пропаноил)-амино)-бутил]борная кислота [11]. Это первый терапевтический ингибитор протеасом, который применяется в клинике для лечения множественной миеломы и лимфомы. Недавно был открыт и исследован D-боро-Ala (NH₂-CHR-B(OR')) — ингибитор ферментов аланин рацемазы и D-Ala-D-Ala лигазы, обладающий активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [12].

В настоящее время разрабатываются основные подходы и методы конъюгации бензоксаборол-содержащих производных, имеющих различные реакционноспособные группы, пригодные для конъюгации, со сложными полифункциональными антибиотиками — гликопептидами [13], полиеновым макролидом амфотерицином В [14] и макролидом кларитромицином [15]. Для ряда гибридных соединений, сочетающих в своей структуре замещённый бензоксаборол и антибиотик эремомицин (I), ванкомицин (II), или агликон тейкопланина продемонстрировали преимущества перед исходными антибиотиками [13].

Установлено, что введение борол-содержащего заместителя в молекулу антибиотика не приводит к заметному уменьшению активности в отношении чувствительных штаммов стафилококков и энтерококков. В то же время некоторые борол-содержащие конъюгаты проявляют активность в отношении устойчивых изолятов стафилококков GISA и энтерококков GRE.

Получение борол-содержащих антибиотиков представляет сложную синтетическую задачу. Внутримолекулярное взаимодействие фрагмента

борной кислоты и полифункционального антибиотика может препятствовать протеканию некоторых реакций, сопровождаться отщеплением фрагмента борной кислоты (деборированием), а также проблемой взаимодействия с реагентами и растворителями, содержащими подвижные протоны (например, спирты, амины и др.). Использование борол-содержащих соединений с незащищённой борольной группировкой часто сопровождается нежелательными процессами, что приводит к низким выходам целевых конъюгатов [13, 14]. Необходимо также учитывать лабильность самих гликопептидных антибиотиков в условиях протекания реакций.

Материал и методы

В работе использованы: сульфат эремомицина (I), полученный на опытной установке ФГБНУ «НИИНА». Применялись реагенты и растворители Aldrich (США), Fluka (Швейцария) или Merck (Германия); гидрохлорид ванкомицина (II) — фирмы Sigma (США). Полноту прохождения реакций, процессы очистки и выделения, а также чистоту полученных соединений контролировали методами ТСХ и ВЭЖХ. ТСХ проводили на алюминиевых пластинках с силикагелем 60 F254 (20×20 см) (Merck, Германия). Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на хроматографе LC-20 (Shimadzu, Япония) с использованием УФ-детектора. Запись велась на длине волны 280 нм. Использована следующая система и колонка (для системы 1): 0,6% HCOONH₄, pH 7,8 и MeCN 8—15% 15 мин, 15—40% 15 мин, 40—70%, 10 мин (колонка Kromasil C8, 4,6×250 мм, размер 5 мкм). Препаративное выделение и очистку соединений осуществляли на колонках с силианизированным силикагелем Kieselgel 60 silanisiert, 0,063—0,200 мм (Merck, Германия). УФ-спектры получали на приборе Unico UV/VIS, Япония. Масс-спектры HRMS получали при ионизации электрораспылением (ESI MS) на приборе Bruker «micrOTOF-Q II» (Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия); образцы растворяли в водном MeOH или AcCN (0,1 мг/мл) и анализировали, вводя со скоростью 3 мкл/мин.

Синтез. Карбоксамиды эремомицина с 4-аминометилфенилборной кислотой (III) или 3-аминометилфенилборной кислотой (IV)

К 0,5 мл диметилсульфоксида при перемешивании добавляли 48 мг (0,03 ммоль) сульфата эремомицина, 80 мкл (0,6 ммоль) диизопропилэтиламина, 60 мг (0,2 ммоль) гидрохлорида пинаколинового эфира 4-аминометилфенилборной кислоты или 3-аминометилфенилборной кислоты и порциями 32 мг (0,06 ммоль) PyBOP. Прохождение реакции контролируют ТСХ на пластинках с силикагелем в системе: бутанол—уксусная кислота—вода (5:2:3). По окончании реакции диметилсульфоксид удаляют 3-кратным добавлением диэтилового эфира (10 мл × 3), отбрасывая каждый раз слой эфира. Выпавшее густое масло растворяют в 0,5 мл воды и высаживают 10 мл ацетона. Полученный осадок отфильтровывают, промывают на фильтре ацетоном, диэтиловым эфиром и сушат в вакууме. Получают в виде белых порошков амиды эремомицина или ванкомицина с пинаколиновыми эфирами 4- или 3-аминометилфенилборной кислоты, соответственно **IIIa** и **IVa**. Выход **IIIa** — 45 мг. ВЭЖХ: Rt = 26,2 (система 1). Масс-спектр ESI MS: вычислено для C₈₆H₁₀₇BClN₁₁O₂₇, м.в. = 1771.7119, найдено — m/z 1772,7224 [M+H]⁺.

Выход **IVa** — 43 мг. ВЭЖХ: Rt = 26,4 (система 1). Масс-спектр, ESI MS: вычислено для C₈₆H₁₀₇BClN₁₁O₂₇, м.в. = 1771.7119, найдено — m/z 1771,7238 [M+H]⁺.

Полученные порошки **IIIa** или **IVa** растворяют в минимальном объёме воды и наносят на колонку с силианизирован-

ным силикагелем, уравновешенным водой. Пропускают сначала 50 мл воды, затем систему 0,25 н уксусная кислота — 50% метанол (1:1). Фракции, содержащие индивидуальное УФ-поглощающее соединение, объединяют и упаривают в вакууме с добавлением н-бутанола при температуре $\sim 37^\circ\text{C}$ до минимального объема водного раствора, к которому добавляют избыток ацетона. Выпавший белый осадок отфильтровывают, промывают ацетоном и высушивают в вакууме. Получают индивидуальные соединения **III** и **IV** в виде белых порошков. Выход **III** — 18 мг (37%). Т. пл. $>270^\circ\text{C}$. ВЭЖХ: $R_t = 22,3$ (система 1), УФ-спектр: (вода + CH_3COOH , $\text{pH} = 6,0$), $\lambda_{\text{max}} = 280,0$ нм., $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 27,7$. Масс-спектр, ESI MS: вычислено для $\text{C}_{80}\text{H}_{97}\text{BClN}_{11}\text{O}_{27}$ м.в. 1689.6337, найдено m/z 1690,6367 $[\text{M}+\text{H}]^{+1}$.

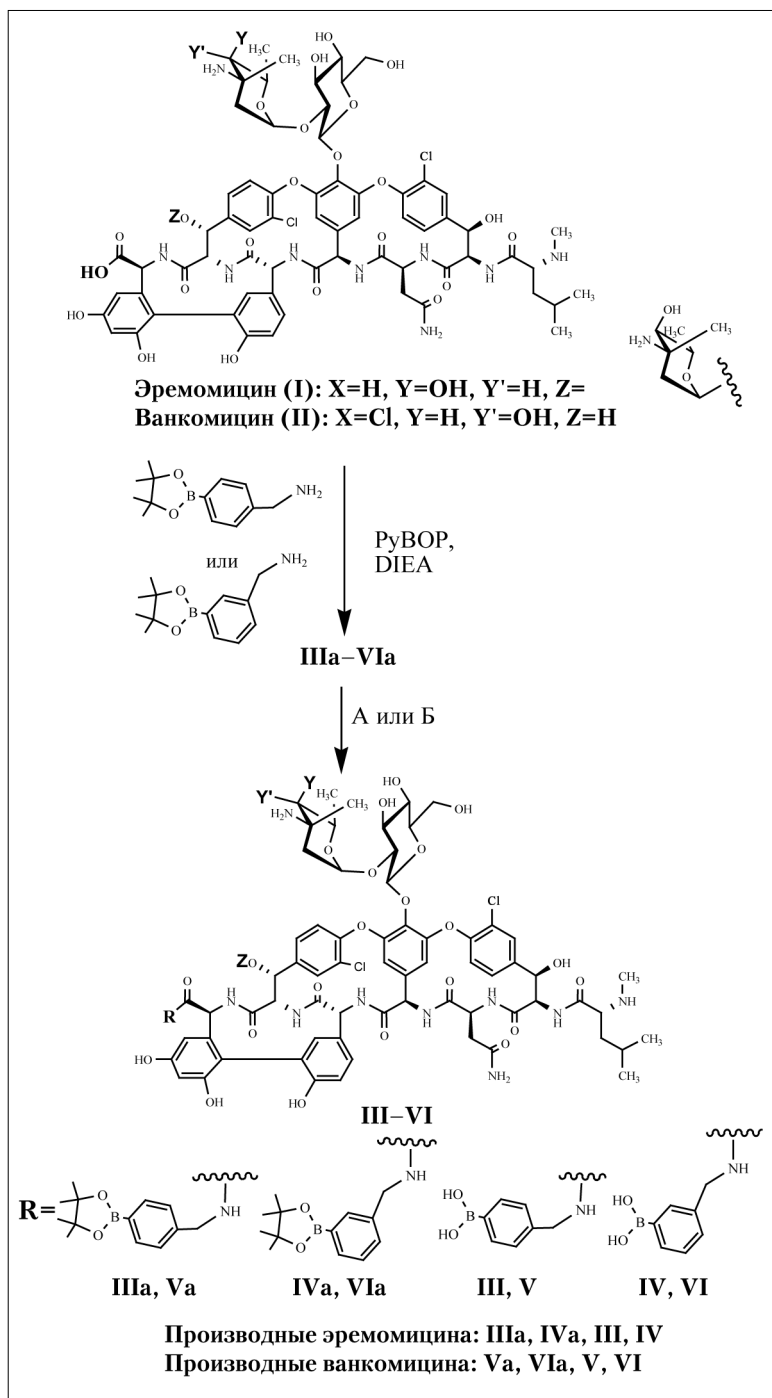
Выход **IV** — 17 мг (35%). Т. пл. $>2700^\circ\text{C}$. ВЭЖХ: $R_t = 22,7$ (система 1). УФ-спектр: (вода + CH_3COOH , $\text{pH} = 6,0$), $\lambda_{\text{max}} = 280,0$ нм.; $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 27,7$. Масс-спектр (ESI MS): вычислено для $\text{C}_{80}\text{H}_{97}\text{BClN}_{11}\text{O}_{27}$ м.в. 1689.63, найдено m/z 1690,63 $[\text{M}+\text{H}]^{+1}$.

Карбоксамиды ванкомицина с 4-аминометилфенилборной кислотой (**V**) и с 3-аминометилфенилборной кислотой (**VI**)

Производные ванкомицина с 4-аминометилфенилборной кислотой (**V**) или с 3-аминометилфенилбороновой кислотой (**VI**) получают аналогично соответствующим производным эремомицина **IIIa** или **IVa**, исходя из гидрохлорида ванкомицина (45 мг, 0,03 ммоль) и соответствующих гидрохлоридов пинаколиновых эфиров 4- или 3-замещённых аминотетилфенилборных кислот (60 мг, 0,22 ммоль). Получают индивидуальные соединения **Va** и **VIa** в виде белых порошков. Выход **Va** — 43 мг. ВЭЖХ: $R_t = 27,75$ (система 1). Выход **VIa** — 43 мг. ВЭЖХ: $R_t = 27,77$ (система 1). Отщепление пинаколиновой защиты от полученных производных проводят нагреванием их в водном растворе при 37°C в течение 24 ч. Полученные растворы упаривают в вакууме при 37°C с добавлением н-бутанола до небольшого объема водного раствора. Осаждением ацетоном с последующим фильтрованием полученного осадка получают индивидуальное соединение **V** или **VI** в виде белого порошка. Выход **V** — 15 мг, (32 %), ВЭЖХ: $R_t = 23,6$ (система 1). Масс-спектр, ESI MS: вычислено для $\text{C}_{73}\text{H}_{83}\text{BCl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{25}$ м.в. 1580.5001, найдено m/z 1581,5035 $[\text{M}+\text{H}]^{+1}$. Выход **VI** — 18 мг (38%). ВЭЖХ: $R_t = 23,7$ (система 1). Масс-спектр, ESI MS: вычислено для $\text{C}_{73}\text{H}_{83}\text{BCl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{25}$ м.в. 1580.5001, найдено m/z 1581,5125 $[\text{M}+\text{H}]^{+1}$.

Определение антибактериальной активности

Определение антибактериальной активности изучаемых производных ванкомицина и эремомицина (**III–VI**) проводилось с использованием микрометода определения минималь-



Синтез производных эремомицина и ванкомицина, содержащих замещённые фенилборные кислоты (**III–VI**).

А. Гидролиз в системе: 0,25 н уксусная кислота: 50% метанол при хроматографии на колонке с силианизированным силикагелем.

Б. Гидролиз в воде при 37°C 24 часа.

ной подавляющей концентрации (МПК) методом серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона с использованием 96-луночных стерильных планшетов [16–18]. Метод разведения основан на использовании двойных последовательных разведений исследуемого вещества от максимальной концентрации к минимальной. При этом исследуемое вещество в различных концентрациях вносят в жидкую питательную среду (бульон). Оценку роста культур проводят визуально, сравнивая рост микроорганизмов в присутствии изучаемых тест-соединений с

ростом культуры без них. Первую наименьшую концентрацию исследуемого вещества (из серии последовательных разведений), при которой визуально не определяется бактериальный рост, принято считать минимальной подавляющей концентрацией (МПК, мкг/мл).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе представлен синтез и изучение новых конъюгатов эремомицина и ванкомицина с бор-содержащими соединениями. Реакцию амидирования антибиотиков **I** или **II** проводили по методу, разработанному для получения карбоксамидов гликопептидов данного класса [19]. Метод хорошо зарекомендовал себя для получения карбоксамидов гликопептидных антибиотиков. В реакции конденсации использовались реагенты с защищённой борной кислотой — пинаколиновые эфиры 4- и 3-аминометилфенилборной кислоты. Взаимодействием этих реагентов с эремомицином (**I**) или ванкомицином (**II**) в присутствии конденсирующего реагента PyBOP при pH ~8.5 в диметилсульфоксиде при комнатной температуре получены соответствующие карбоксамиды эремомицина с пинаколиновым эфиром 4- и 3-аминометилфенилборной кислоты (**IIIa**) и (**IVa**) и карбоксамиды ванкомицина с пинаколиновым эфиром 4- и 3-аминометилфенилборной кислоты (**Va**) и (**VIa**) (рисунок). Реакция протекает с образованием одного основного целевого продукта.

В процессе очистки (от минорных примесей) полученных производных эремомицина **IIIa** и **IVa** на колонке с силанизированным силикагелем во время элюции системой 0,25 н уксусная кислота — 50% метанол (1:1) происходит количественное отщепление защитной пинаколиновой группировки с образованием соответствующих карбоксамидов эремомицина с 4- (**III**) и с 3-аминометилфенилборной кислотой (**IV**). Гидролиз пинаколиновых эфиров ванкомицина **Va** и **VIa** в воде при 37°C в течение 24 часов также приводит к свободным карбоксамидам эремомицина и ванкомицина с 4- и с 3-аминометилфенилбороновой кислотой (**V**) и (**VI**) соответственно (рисунок).

Новые производные гликопептидов **III—VI** получены с удовлетворительным выходом 32—38 %. в результате двух стадий синтеза и очистки на колонке на силанизированном силикагелем. Строение полученных соединений вытекает из пути синтеза и подтверждается совокупностью физико-химических и спектральных характеристик.

Изучение антибактериальной активности (таблица) показало, что производные эремомицина и ванкомицина, содержащие остаток 4-замещённой фенилборной кислоты **III** и **V** соответственно обладают высокой антибактериальной активностью, сравнимой с антибактериальной активностью эремомицина (**I**)(МПК). Это выражается не только в отношении чувствительных к гликопептидам штаммов *S.epidermidis* 533, *S.haemolyticus* 602 и *E.faecalis* 559, *Enterococcus faecium* 568, но и в отношении стафилококков с пониженной чувствительностью (*S.aureus* 3797 и *S.aureus* 3798) (GISA). Производные эремомицина и ванкомицина, содержащие остаток 3-замещённой фенилборной кислоты **IV** и **VI**, соответственно, по антибактериальной активности (МПК) приближаются к ванкомицину (**II**). В отношении штаммов резистентных энтерококков *E.faecium* 569 и *E.faecalis* 560 (GRE) новые производные не активны так же, как и исходные антибиотики.

Заключение

Амидированием концевой карбоксильной группы антибиотиков эремомицина (**I**) и ванкомицина (**II**) пинаколиновыми эфирами 4- или 3-аминометилфенилборными кислотами в присутствии конденсирующего реагента PyBOP с последующим удалением пинаколиновой защиты в мягких условиях гидролиза, получены новые борол-содержащие карбоксамиды этих антибиотиков (**III—VI**) с удовлетворительными выходами. Установлено, что активность 4-замещённых производных борол-содержащих антибиотиков эремомицина и ванкомицина практически равна активности исходных антибиотиков, но выше активности соответствующих 3-замещённых производных борол-содержащих производных в от-

Определение МПК (мкг/мл) производных гликопептидов (**III—VI**) в сравнении с эремомицином (**I**) и ванкомицином (**II**) в отношении Gr⁺ микроорганизмов

Бактериальные штаммы	МПК, мкг/мл					
	ванкомицин	эремомицин	III	IV	V	VI
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 533	1,0	0,13	0,13	2,0	0,25	2,0
<i>S.haemolyticus</i> 602	0,5	0,13	0,13	1,0	0,25	2,0
<i>S.aureus</i> 3797	4,0	8,0	0,5	4,0	1,0	8,0
<i>S.aureus</i> 3798	4,0	8,0	2,0	8,0	4,0	16,0
<i>Enterococcus faecalis</i> 559	1,0	0,13	0,25	2,0	0,5	2,0
<i>E.faecium</i> 568	2,0	0,13	0,25	4,0	0,5	2,0
<i>E.faecium</i> 569	>64,0	>64,0	32,0	>64,0	>64,0	>64,0
<i>E.faecalis</i> 560	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0

ношении большинства изученных штаммов грамположительных бактерий.

Благодарности.

Авторы выражают благодарность сотруднику Института ФГБНУ «НИИНА» Н. М. Малютиной

за проведение метода ВЭЖХ анализа образцов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ КИАС № 13-03-00643 А (2013—2015 гг).

ЛИТЕРАТУРА

1. Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *Antibiotics* 2012; 65: 385—395.
2. Faier R.J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 2014; 6: 25—64.
3. Ashford P.A., Bew S.P. Recent advances in the synthesis of new glycopeptide antibiotics. *Chem Soc Rev* 2012; 41: 957—978.
4. Hattangady D.S., Singh A.K., Muthaiyan A. et al. Genomic, transcriptomic and metabolomic studies of two well-characterized, laboratory-derived vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains derived from the same parent strain. *Antibiotics* 2015; 4: 76—112.
5. Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н. Изучение связи структурно-активности в ряду полусинтетических антибиотиков группы полициклических гликопептидов. *Биоорг хим* 2006; 32: 4: 1—21. / Olsuf'eva E.N., Preobrazhenskaja M.N. Izuchenie svyazi struktura-aktivnost' v rjadu polusinteticheskikh antibiotikov gruppy politsiklicheskikh glikopeptidov. *Bioorg him* 2006; 32: 4: 1—21. [in Russian]
6. Preobrazhenskaya M.N., Olsufyeva E.N. Patents on glycopeptides of the vancomycin family and their derivatives as antimicrobials: January 1999—June 2003. *Ex Opin Ther Pat* 2004; 14: 2: 1—33.
7. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *Antibiotics* 2013; 66: 571—591.
8. Van Bambeke F. Glycopeptides and glycopeptide antibiotics in clinical development: a comparative review of their antibacterial spectrum, pharmacokinetics and clinical efficacy. *Curr Opin Invest Drugs* 2006; 7: 8: 740—749.
9. Тевяшова А.Н., Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н. Создание антибиотиков двойного действия как путь поиска новых перспективных лекарственных препаратов. *Успехи химии* 2015; 84: 1: 61—97. / Tevjashova A.N., Olsuf'eva E.N., Preobrazhenskaja M.N. Sozdanie antibiotikov dvojnogo dejstviya kak put' poiska novyh perspektivnykh lekarstvennykh preparatov. *Uspехи himii* 2015; 84: 1: 61—97. [in Russian]
10. Liu C.T., Tomsho J.W., Benkovic S.J. The unique chemistry of benzoxaboroles: current and emerging applications in biotechnology and therapeutic treatments. *Bioorgan Med Chem*. 2014; 22: 4462—4473.
11. Adams J., Kauffman M. Development of the Proteasome Inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 2004; 22: 2: 304—311.
12. Putty S., Rai A., Jamindar D. et al. Characterization of d-boroAla as a novel broad-spectrum antibacterial agent targeting d-Ala-d-Ala ligase. *Chem Biol Drug Design* 2011; 78: 5: 11: 757—763.
13. Printsevskaya S.S., Reznikova M.I., Korolev A.M. et al. Synthesis and study of antibacterial activities of antibacterial glycopeptide antibiotics conjugated with benzoxaboroles. *Future Med Chem* 2013; 5: 6: 641—652.
14. Tevyashova A.N., Printsevskaya S.S., Olsufyeva E.N. et al. The use of benzoxaboroles for constructing of dual-acting antibiotics on the basis of glycopeptides and amphotericin B. *Abstr. 14 International Conference on the Chemistry of Antibiotics and other Bioactive Compounds, ICCA-2015, 2015; October 13–16: Galveston: Texas: USA: P 20.*
15. Lapa G.B., Korolev A.M., Luzikov Y.N. et al. Two approaches to the use of bezo[c][1,2]oxaboroles as active fragments for synthetic transformation of clarithromycin. *Abstr. XV International Conference «Heterocycles in Bioorganic Chemistry» Riga. Latvia. 2013; May 27—30: PO 135: 192.*
16. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04). Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 04.03.2004 г. / Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam (Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04). Utverzhdeny i vvedeny v dejstvie Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossijskoj Federacii G.G.Onishhenko 04.03.2004 g. [in Russian]
17. Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств / часть первая. Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2012. / Rukovodstvom po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv / chast' pervaja. Izdanie FGBU «NCJeSMP» Minzdravsocrazvitiya Rossii, 2012. [in Russian]
18. Рекомендациями Национального Комитета Клинических Лабораторных Стандартов США (NCCLS), [NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antibacterial Susceptibility Testing, USA 2000]. / Rekomendacijami Nacional'nogo Komiteta Klinicheskikh Laboratornykh Standartov SShA
19. Printsevskaya S.S., Pavlov A.Y., Olsufyeva E.N. et al. Synthesis and mode of action of hydrophobic derivatives of glycopeptide antibiotic eremomycin and des-(N-methyl-D-leucyl) eremomycin against glycopeptide-sensitive and — resistant bacteria. *J Med Chem* 2002; 45: 1340—1345.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Олсуфьева Е.Н. — главный научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Бычкова Е.Н. — научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Королёв А. М. — главный научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Мирчин Е. П. — ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Исакова Е. Б. — научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Прогнозирование развития антибиотикорезистентности бактерий методами фармакокинетико-фармакодинамического моделирования: альтернативные подходы к анализу экспериментальных данных

М. В. ГОЛИКОВА, Е. Н. СТРУКОВА, Ю. А. ПОРТНОЙ, А. А. ФИРСОВ

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

PK/PD Modeling as a Tool for Predicting Bacterial Resistance to Antibiotics: Alternative Analyses of Experimental Data

M. V. GOLIKOVA, E. N. STRUKOVA, Y. A. PORTNOY, A. A. FIRSOV

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Оценка численности мутантов после многократного введения антибиотика (N_M) — основной параметр, который используется в исследованиях процессов развития резистентности бактерий с помощью динамических систем *in vitro*, моделирующих фармакокинетику антибиотиков. С целью сравнения N_M с недавно предложенным интегральным параметром $AUBC_M$ (площадь под кривой «численность мутантов — время») проведён анализ процессов селекции *Staphylococcus aureus* при моделировании *in vitro* режимов моно- (даптомицин, доксициклин) и комбинированной (даптомицин + рифампицин, рифампицин + линезолид) терапии. Различия в кинетических кривых изменения численности резистентных мутантов *S. aureus* удалось выразить параметром $AUBC_M$, но не N_M . Кроме того, в отличие от $AUBC_M$ параметр N_M не позволял отразить очевидные различия в кинетических кривых изменения численности мутантов, резистентных к 2-, 4-, 8- и 16-кратному показателю МПК доксициклина и рифампицина. Полученные результаты свидетельствуют о преимуществах $AUBC_M$ перед N_M при количественной оценке селекции резистентных мутантов.

Ключевые слова: динамическая система *in vitro*, антибиотики, резистентность, *S. aureus*.

Postexposure number of mutants (N_M) is a conventional endpoint in bacterial resistance studies using *in vitro* dynamic models that simulate antibiotic pharmacokinetics. To compare N_M with a recently introduced integral parameter $AUBC_M$, the area under the time course of resistance mutants, the enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* was studied *in vitro* by simulation of mono- (daptomycin, doxycycline) and combined treatments (daptomycin + rifampicin, rifampicin + linezolid). Differences in the time courses of resistant *S. aureus* could be reflected by $AUBC_M$ but not N_M . Moreover, unlike $AUBC_M$, N_M did not reflect the pronounced differences in the time courses of *S. aureus* mutants resistant to 2×, 4×, 8× and 16×MIC of doxycycline and rifampicin. The findings suggested that $AUBC_M$ was a more appropriate endpoint of the amplification of resistant mutants than N_M .

Key words: *in vitro* dynamic model, antibiotics, resistance, *S. aureus*.

Введение

Развитие антибиотикорезистентности у патогенных бактерий — важнейший фактор снижения эффективности антибиотиков, который приобретает особое значение на фоне резкого сокращения числа оригинальных препаратов, созданных в последние годы. Это обстоятельство стимулирует поиск новых подходов к рациональному применению существующих и направленному поиску новых антибиотиков.

Среди таких подходов наиболее перспективными сегодня считается фармакокинетико-фармакодинамическое моделирование. Его основным

инструментом являются динамические системы, которые позволяют изучать кинетику гибели бактерий при моделировании *in vitro* фармакокинетических профилей, реализуемых у человека. Основным принцип моделирования фармакокинетики в динамической системе состоит в контролируемом разбавлении раствора антибиотика в центральной камере, где он взаимодействует с тестируемым микроорганизмом. В зависимости от сложности моделируемого фармакокинетического профиля (от моно- до полиэкспоненциального) динамическая система может состоять из одной (центральной) или центральной и нескольких периферических камер (по числу экспонент в уравнении фармакокинетики), которые обеспечивают перенос антибиотика из центральной камеры в периферическую и обратно [1].

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: Москва, 119021, Большая Пироговская ул., д. 11, стр. 1. «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе»

В отличие от традиционных исследований *in vitro*, проводимых при постоянной концентрации антибиотика, динамические системы позволяют изучать его действие при непрерывно меняющейся концентрации — той самой, которая достигается в крови человека, получающего курс антибиотикотерапии. Это позволяет обойти проблему межвидовой (от животного к человеку) экстраполяции данных, нерешённость которой существенно ограничивает прогностическое значение экспериментальной химиотерапии. С помощью динамических систем *in vitro* оказалось возможным прогнозировать не только воздействие антибиотиков на чувствительные к ним бактерии, но и изучать процессы развития антибиотикорезистентности при клинических режимах введения препаратов [2].

Для прогнозирования селекции резистентных мутантов необходимо знание её зависимости от фармакокинетических переменных, прежде всего, от площади под кривой «концентрация антибиотика — время» (AUC). Такая зависимость была впервые установлена для *Staphylococcus aureus* при моделировании *in vitro* фармакокинетических профилей фторхинолонов [3]. Кривые зависимости от AUC/МПК изменений в чувствительности *S. aureus*, происходивших при многократном введении гатифлоксацина, левофлоксацина, моксифлоксацина или ципрофлоксацина в динамическую систему, имели колоколообразную форму. При относительно низких и, наоборот, высоких значениях AUC/МПК чувствительность бактерий к гатифлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину и ципрофлоксацину не менялась, а при промежуточных значениях AUC/МПК снижалась. Столь необычную форму кривых «AUC/МПК — отношение конечного значения МПК к исходному» удалось объяснить теорией «окна резистентности» (Mutant Selection Window — MSW [4]), в соответствии с которой селекция резистентных мутантов наиболее вероятна в тех случаях, когда концентрация антибиотика *in vitro* и *in vivo* выше его МПК, но ниже уровней, при которых антибиотикорезистентность, или иначе говоря, концентрация, предотвращающая селекцию мутантов, не развивается (Mutant Prevention Concentration — MPC). Позднее куполообразные кривые зависимости «AUC/МПК — резистентность» (как по изменениям чувствительности бактерий, так и по данным популяционного анализа) были описаны не только для фторхинолонов [5–15], но и для других антибиотиков [16].

Несмотря на решающий прорыв, наметившийся в деле прогнозирования антибиотикорезистентности бактерий с помощью динамических систем, методология проведения и анализа результатов таких исследований, в частности по-

пуляционных данных, пока ещё только формируется. Задачей настоящей работы стало сравнение интегральной и точечной оценок кинетических кривых, отражающих изменения в численности резистентной популяции во времени. В качестве интегральной оценки был использован недавно предложенный параметр AUBC_М (площадь под кинетической кривой изменения численности резистентных мутантов [6]), в качестве точечной — традиционно оцениваемая численность мутантов в конце эксперимента (N_M).

Материал и методы

Антибиотики, бактериальные штаммы и оценка их чувствительности. Линезолид был любезно предоставлен фирмой Pfizer Corp. (США), доксициклин и рифампицин — MP Biomedicals LLC (США) и даптомицин — Cubist Pharmaceuticals, Inc (США).

В работе были использованы 2 штамма *Staphylococcus aureus* — клинический *S. aureus* 10 (линезолид и рифампицин) и коллекционный *S. aureus* ATCC 43300 (доксициклин, рифампицин и даптомицин). Значения МПК антибиотиков устанавливали методом двукратных серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона (МХБ [17]), обогащённого ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} , с использованием 24-часовых культур при исходной численности клеток — 5×10^5 КОЕ/мл. Значения МПК линезолида и рифампицина для *S. aureus* 10 составили 2 и 0,016 мг/л соответственно, а доксициклина, рифампицина и даптомицина для *S. aureus* ATCC 43300 — 0,1; 0,012 и 0,39 мг/л соответственно.

Моделируемые фармакокинетические профили. Во всех случаях моделировали моноэкспоненциальные фармакокинетические профили антибиотиков со значениями периода полувыведения, установленными при клиническом изучении фармакокинетики линезолида ($T_{1/2} = 6$ ч [18]), доксициклина ($T_{1/2} = 15$ ч [19]), рифампицина ($T_{1/2} = 3$ ч [20]) и даптомицина ($T_{1/2} = 9$ ч [21]). Линезолид вводили два раза в сутки с интервалом в 12 ч, а доксициклин, рифампицин и даптомицин — один раз в сутки в течение 5 дней.

Моделируемые отношения площади под фармакокинетической кривой в пределах 24 ч (AUC) к МПК составили для линезолида 60 и 120 ч, для доксициклина — 90 и 180 ч, для рифампицина — 925 и 1850 ч (*S. aureus* 10) и 100 ч (*S. aureus* ATCC 43300), для даптомицина — 64 ч. Все эксперименты проводились в двух или более повторностях.

Динамическая система *in vitro*. Для изучения фармакодинамики линезолида, доксициклина, рифампицина и даптомицина использовали динамическую систему, описанную ранее [22]. Она представляет собой две камеры — одна со свежим МХБ (вспомогательный сосуд), другая с МХБ, содержащим бактериальную культуру с антибиотиком (основной сосуд № 1). При помощи одного перистальтического насоса МХБ из вспомогательной камеры со свежим МХБ поступает в сосуд № 1 объёмом 100 мл; при помощи другого насоса его содержимое удаляется с той же объёмной скоростью (F). Скорость потока для линезолида составляла 11,6 мл/ч, для доксициклина — 4,6 мл/ч, для рифампицина — 23,1 мл/ч и для даптомицина — 7,7 мл/ч.

Для одновременного моделирования моноэкспоненциальных профилей двух антибиотиков (линезолид и рифампицин; даптомицин и рифампицин), характеризующихся разными значениями периода полувыведения ($T_{1/2}$), был использован принцип суперпозиции потоков, поскольку каждому из антибиотиков соответствует свое собственное значение F. При этом использовалась более сложная динамическая система [23], состоящая из трёх камер. В этом случае вспомогательная камера со свежим МХБ параллельно соединена с

двумя камерами — основной (№ 1) и дополнительной (№ 2), которая в свою очередь соединена с камерой № 1. В начальный момент времени в камеру № 1, содержащую МХБ с бактериальной культурой, добавляли оба антибиотика, а в камеру № 2 — только один антибиотик, характеризующийся более высоким значением $T_{1/2}$ (линезолид или даптомицин), в количестве, необходимом для достижения заданных значений их начальной концентрации (C_0). Для воспроизведения неодинаковой скорости элиминации линезолида/даптомицина и рифампицина МХБ из вспомогательной камеры подается в камеру № 1 с объемной скоростью $F_{\text{лин/дап}}$, а в камеру № 2 — с объемной скоростью, вычисляемой по формуле $F_{\text{риф}} - F_{\text{лин/дап}}$. С той же объемной скоростью $F_{\text{риф}} - F_{\text{лин/дап}}$ МХБ с линезолидом/даптомицином подается из камеры № 2 в камеру № 1 складывается из $F_{\text{лин/дап}}$ и $(F_{\text{риф}} - F_{\text{лин/дап}})$, т.е. равна $F_{\text{риф}}$. Таким образом, удается предотвратить слишком быстрое выведение линезолида/даптомицина из основной камеры, определяемое величиной $F_{\text{риф}}$, и сохранить постоянство её объема. Поскольку с той же объемной скоростью удаляется содержимое камеры № 1, её объём сохраняется постоянным. При этом значения $F_{\text{лин/дап}}$ и $F_{\text{риф}}$ рассчитываются по формуле $F = k_{el} \cdot V$, где k_{el} — константа элиминации антибиотика, а V — объём камеры № 1. Для 100 мл объёма среды в камере № 1 (V_1) значения $F_{\text{лин}}$, $F_{\text{дап}}$ и $F_{\text{риф}}$ составляли 11,6; 7,7 и 23,1 мл/ч соответственно. Объём камеры № 2 (V_2), рассчитанный по формуле $V_2 = [(F_{\text{риф}} - F_{\text{лин/дап}})/F_{\text{лин/дап}}] \times V_1$, составлял для экспериментов с линезолидом и рифампицином 100 мл, а с даптомицином и рифампицином 200 мл.

Надежность воспроизведения фармакокинетических профилей антибиотиков была подтверждена ранее на примере линезолида [24].

Микробиологические исследования. Перед началом опыта динамическую систему заполняли свежим МХБ и термостатировали при 37°C. В центральную камеру вносили 18-часовую бактериальную культуру с концентрацией клеток примерно 10^8 КОЕ/мл, а затем, после полчасовой инкубации, вводили антибиотик. При фармакодинамическом изучении комбинации линезолида с рифампицином использовали смешанный инокулум чувствительных и резистентных к линезолиду (МПК 8 мг/л) клеток *S.aureus* 10 в соотношении 10^8 КОЕ к 1 КОЕ [22].

На протяжении каждого эксперимента из центральной камеры отбирали пробы объёмом 100 мкл, которые последовательно разводили стерильной дистиллированной водой для уменьшения концентрации препарата ниже уровня МПК, чтобы предотвратить действие оставшегося в пробе антибиотика («antibiotic carry-over»). Затем пробы высевали на чашки Петри, содержащие агар Мюллера-Хинтон II. Нижний предел определения составлял 2×10^2 КОЕ/мл.

Популяционный анализ проводили путём посева проб каждые 24 ч на чашки с агаром Мюллера-Хинтон II, содержащим антибиотик в концентрации 2, 4, 8 или 16 МПК. Предел определения — 10 КОЕ/мл. Интенсивность роста резистентных мутантов характеризовали численностью клеток каждого уровня резистентности через 120 ч от начала введения антибиотика (N_M). Величину AUC_{SCM} определяли как площадь под кинетической кривой изменения численности устойчивых к антибиотику мутантов в пределах от 0 до 120 ч, ограниченную снизу пределом количественного определения [6].

Результаты и обсуждение

Кинетические кривые, отражающие изменения в численности резистентных мутантов *S.aureus* при моделировании многократного введения антибиотиков в динамической системе,

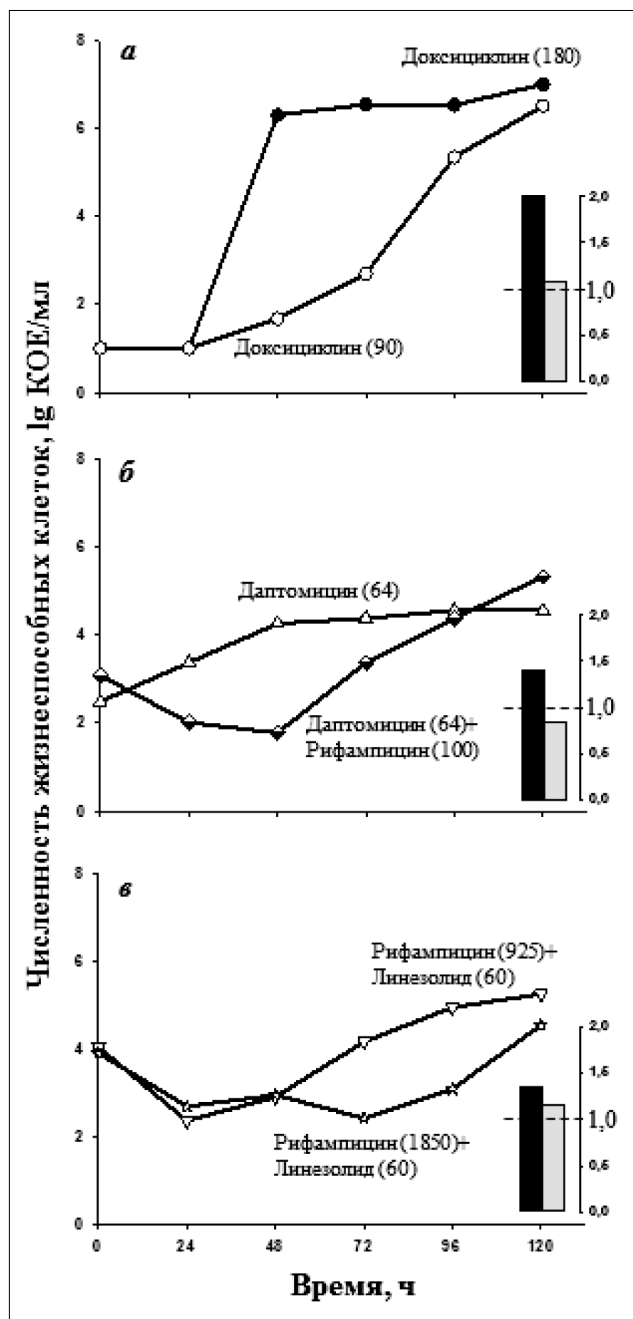


Рис. 1. Изменение численности субпопуляций штаммов *S.aureus* (а и б — *S.aureus* ATCC 43300, в — *S.aureus* 10), устойчивых к 16МПК доксициклина (а), 2МПК даптомицина (б) и 4МПК рифампицина (в) в зависимости от AUC/МПК.

В правом нижнем углу отношения AUC_{SCM} (черные прямоугольники; а — доксициклин (180) / доксициклин (90); б — даптомицин (64) + рифампицин (100) / даптомицин (64) и в — рифампицин (925) + линезолид (60) / рифампицин (1850) + линезолид (60)) и соответствующие отношения N_M (серые прямоугольники). В скобках указаны значения AUC/МПК (в ч). Пояснения — см. в тексте.

показаны на рис. 1. Как видно на рис. 1, а, в процессе ежедневного введения доксициклина в дозе, соответствующей AUC/МПК = 180 ч, селекция мутантов, резистентных к 16МПК

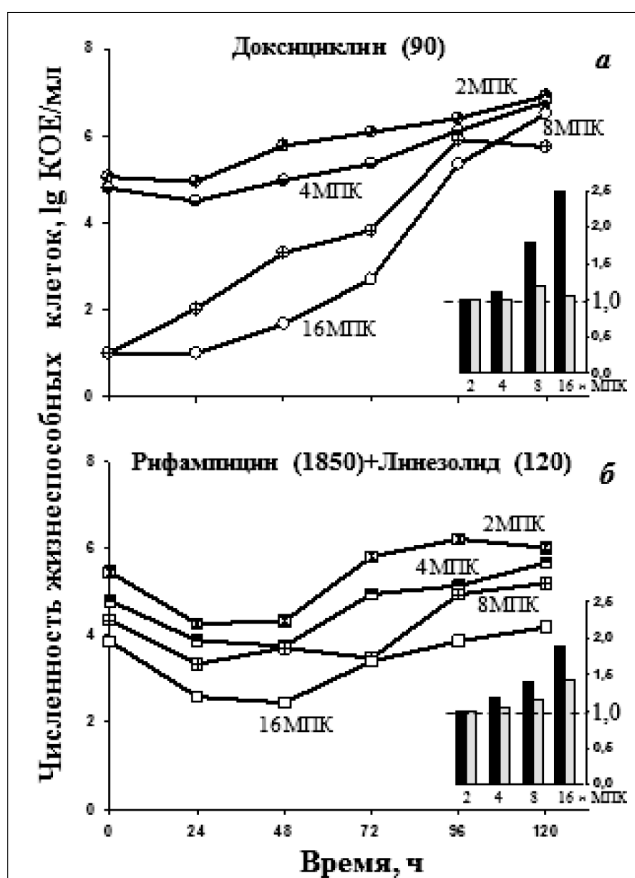


Рис. 2. Изменение численности субпопуляций штаммов *S. aureus* (а — *S. aureus* 10 и б — *S. aureus* ATCC 43300) в зависимости от уровня устойчивости соответственно к доксициклину и рифампицину. В правом нижнем углу отношения $AUBC_M$ при 2, 4, 8 и 16 МПК к $AUBC_M$ при 2 МПК (черные прямоугольники) и соответствующие отношения N_M (серые прямоугольники). В скобках указаны значения AUC/MPK (в ч).

антибиотика, происходила более интенсивно, чем при его введении в дозе, соответствующей $AUC/MPK = 90$ ч. В первом случае нарастание численности мутантов происходило уже на 2-й день, а во втором — лишь на 4-й, однако к концу периода наблюдения (120 ч) численность мутантов в обоих случаях была практически одинаковой. В результате значения параметра N_M для моделируемых режимов дозирования доксициклина оказались близкими, в отличие от далеко не одинаковых значений параметра $AUBC_M$. Как видно на диаграмме в правом углу рисунка, значения N_M различались в 1,1 раза, а $AUBC_M$ — в 2 раза.

Подобные различия были выявлены и при анализе кинетических кривых, полученных при моделировании режимов комбинированной терапии (рис. 1, б и рис. 1, в). Так, очевидное снижение численности мутантов *S. aureus*, резистентных к даптомицину, при его введении в комбинации с рифампицином могло быть отражено параметром $AUBC_M$, но не параметром N_M

(см. рис. 1, б). Как видно на диаграмме, в результате использования комбинации величина $AUBC_M$ уменьшалась в 1,4 раза по сравнению с таковой при моделировании монотерапии даптомицином, тогда как величина N_M , напротив, даже несколько возрастала. Те же недостатки параметра N_M проявились и при анализе кинетических кривых, полученных в экспериментах с комбинацией рифампицина с линезолидом (см. рис. 1, в). Как видно на диаграмме, различия в значениях N_M , отмеченных для моделируемых режимов рифампицина ($AUC/MPK = 925$ ч против $AUC/MPK = 1850$ ч) в комбинации с линезолидом ($AUC/MPK = 60$ ч) были меньше, чем для соответствующих значений $AUBC_M$.

Неадекватность характеристики популяционных данных с помощью параметра N_M отмечена и при анализе кривых, отражающих селекцию мутантов с различной степенью резистентности к антибиотикам. При моделировании многократного введения доксициклина не только исходная численность спонтанных мутантов *S. aureus*, но и её последующее нарастание, в частности мутантов, резистентных к 2 и 4 МПК антибиотика, заметно отличались от таковых для мутантов, резистентных к 8 и 16 МПК (рис. 2, а). Эти различия оказалось возможным отобразить с помощью параметра $AUBC_M$, но не N_M . В отличие от систематического снижения $AUBC_M$ по мере повышения уровня резистентности для мутантов, величина N_M практически не менялась (см. диаграмму). Подобные закономерности установлены и при комбинированной антибиотикотерапии (см. рис. 2, б). Как видно на рисунке, и в этом случае исходная численность рифампициноустойчивых мутантов и её последующее нарастание зависели от уровня резистентности при сочетанном применении рифампицина с линезолидом. Эти различия отображались изменениями параметра $AUBC_M$, но не N_M — см. диаграмму.

Заключение

Проведённый анализ возможностей использования интегрального ($AUBC_M$) и точечного (N_M) параметров для оценки селекции резистентных мутантов позволяет отметить, что в отличие от $AUBC_M$ параметр N_M не всегда отражает различия между кинетическими кривыми изменения численности мутантов *S. aureus*, резистентных к даптомицину, рифампицину и доксициклину, наблюдаемые при разных значениях AUC/MPK , а также при разных уровнях антибиотикорезистентности мутантов. Следствием этого может быть искажённое представление о взаимосвязи между селекцией мутантов и AUC/MPK , вплоть до ложного впечатления о том, что развитие антибиотикорезистентности бактерий не зависит от AUC/MPK . Таким обра-

зом, интегральный параметр $AUBC_M$ имеет очевидные преимущества перед точечным параметром N_M для количественной характеристики процессов развития резистентности бактерий при моделировании *in vitro* режимов антибиотикотерапии с помощью динамических систем. Ранее те же недостатки точечных параметров были отмечены применительно к характеристи-

ке киллинг-кривых, отражающих воздействие антибиотиков на чувствительные к ним субпопуляции бактерий [25–27].

Исследование проведено благодаря финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ, соглашение №14-15-00970).

ЛИТЕРАТУРА

1. Фирсов А.А., Назаров А.Д., Черных В.М. Фармакокинетические подходы к оптимизации антибиотикотерапии. Итоги науки и техники. ВИНТИ, М.: 1989; 17: 1–228. / Firsov A.A., Nazarov A.D., Chernyh V.M. Farmakokineticheskie podhody k optimizacii antibiotikoterapii. Itogi nauki i tehniki. VINITI, M.: 1989; 17: 1–228. [in Russian]
2. Firsov A.A., Zinner S.H., Lubenko I.Y. *In vitro* dynamic models as tools to predict antibiotic pharmacodynamics. In: Nightingale C.H., Ambrose P.G., Drusano G.L., Murakawa T. (Ed.). Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. 2nd ed, section II, Non-clinical models of infection. Informa Healthcare USA 2007; 45–78.
3. Firsov A.A., Vostrov S.N., Lubenko I.Y. *et al.* *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1604–1613.
4. Blondeau J.M., Hansen G., Metzler K., Hedlin P. The role of PK/PD parameters to avoid selection and increase of resistance: mutant prevention concentration. J Chemother 2004; 16 (Suppl 3):1–19.
5. Firsov A.A., Vostrov S.N., Lubenko I.Y. *et al.* ABT492 and levofloxacin: comparison of their pharmacodynamics and their abilities to prevent selection of resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* dynamic model. J Antimicrob Chemother 2004; 54:178–186.
6. Firsov A.A., Smirnova M.V., Strukova E.N. *et al.* Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. Int J Antimicrob Agents 2008; 32: 488–493.
7. Firsov A.A., Strukova E.N., Shlykova D.S. *et al.* Bacterial resistance studies using *in vitro* dynamic models: the predictive power of the mutant prevention and minimum inhibitory antibiotic concentrations. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 4956–4962.
8. Firsov A.A., Portnoy Y.A., Strukova E.N. *et al.* Predicting bacterial resistance using the time inside the mutant selection window: possibilities and limitations. Int J Antimicrob Agents 2014; 44: 301–305.
9. Firsov A.A., Strukova E.N., Portnoy Y.A. *et al.* Bacterial antibiotic resistance studies using *in vitro* dynamic models: Population analysis vs. susceptibility testing as endpoints of mutant enrichment. Int J Antimicrob Agents 2015; 46: 313–318.
10. MacGowan A.P., Rogers C.A., Holt H.A., Bowker K.E. Activities of moxifloxacin against, and emergence of resistance in, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacokinetic model. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1088–1095.
11. Zinner S.H., Lubenko I.Y., Gilbert D. *et al.* Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 616–622.
12. Oonishi Y., Mitsuyama O., Yamaguchi K. Effect of GrlA mutation on the development of quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacokinetic model. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 1030–1037.
13. Tam V.H., Louie A., Deziel M.R. *et al.* The relationship between quinolone exposures and resistance amplification is characterized by an inverted U: a new paradigm for optimizing pharmacodynamics to counterselect resistance. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 744–747.
14. Liang B., Bai N., Cai Y. *et al.* Mutant prevention concentration-based pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother 2011; 55: 2409–2412.
15. Gebru E., Choi M.-J., Lee S.-J. *et al.* Mutant-prevention concentration and mechanism of resistance in clinical isolates and enrofloxacin/ marbofloxacin-selected mutants of *Escherichia coli* of canine origin. J Med Microbiol 2011; 60: 1512–1522.
16. Firsov A.A., Smirnova M.V., Lubenko I.Y. *et al.* Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an *in vitro* dynamic model. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 1185–1192.
17. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. Eighth Edition. CLSI document M-07-08, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
18. Moellering R.C. Jr. A novel antimicrobial agent joins the battle against resistant bacteria. Ann Intern Med 1999; 130: 155–157.
19. Agwuh K., MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 256–265.
20. Jaakkola T., Backman J.T., Neuvonen M. *et al.* Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of pioglitazone. Br J Clin Pharmacol 2006; 61: 70–78.
21. Woodworth J.R., Nyhart E.H., Jr., Brier G.L. *et al.* Single-dose pharmacokinetics and antibacterial activity of daptomycin, a new lipopeptide antibiotic, in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 318–325.
22. Firsov A.A., Golikova M.V., Strukova E.N. *et al.* *In vitro* resistance studies with bacteria that exhibit low mutation frequencies: prediction of «antimutant» linezolid concentrations using a mixed inoculum containing both susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59: 1014–1019.
23. Blaser J., Stone B.B., Zinner S.H. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units. J Antimicrob Chemother 1985; 15: Suppl A: 131–137.
24. Smirnova M.V., Strukova E.N., Portnoy Y.A. *et al.* Linezolid pharmacodynamics with *Staphylococcus aureus*, alone and in 2 combination with doxycycline in an *in vitro* dynamic model. J Chemother 2011; 23: 140–144.
25. Firsov A.A., Vostrov S.N., Shevchenko A.A., Cornaglia G. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1281–1287.
26. Firsov A.A., Lubenko I.Y., Portnoy Y.A. *et al.* Relationships of the area under the curve/MIC ratio to different endpoints of the antimicrobial effect: gemifloxacin pharmacodynamics in an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 927–931.
27. Firsov A.A., Zinner S.H., Vostrov S.N. *et al.* AUC/MIC relationships to different endpoints of the antimicrobial effect: multiple-dose *in vitro* simulations with moxifloxacin and levofloxacin. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 533–539.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фирсов Александр Алексеевич — Чл.-корр. РАН, д. б. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики и фармакодинамики, НИИНА им. Г.Ф.Гаузе, Москва

Голикова Мария Владимировна — к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Струкова Елена Николаевна — к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Портной Юрий Абрамович — с. н. с. лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Обнаружение генетических маркеров резистентности к β -лактамам антибиотикам у грамотрицательных микроорганизмов с помощью ПЦР-диагностики

Е. С. ЛИСИЦЫНА¹, Т. В. ЧЕРНЕНЬКАЯ², Е. Н. ИЛЬИНА³, И. В. ЛАЗАРЕВА⁴, В. А. АГЕЕВЦ⁴, С. В. СИДОРЕНКО⁴

¹ НПФ «Литех», Москва, Россия

² НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

³ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

⁴ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург

Discovery of Genetic Markers of Resistance to β -Lactams in Gramnegative Microorganisms by PCR Diagnosis

E. S. LISITSINA, T. V. CHERNENKAYA, E. N. ILYINA, I. V. LAZAREVA, V. A. AGEEVETS, S. V. SIDORENKO

Litekh Co., Moscow

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

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow

Research Institute of Children's Infections, Federal Medico-Biological Agency, St.Petersburg

В исследование включены образцы биологического материала (15 образцов гемокультуры и 89 образцов бронхоальвеолярного лаважа), из которого были выделены монокультуры грамотрицательных бактерий устойчивых к цефотаксиму, цефепиму, имипенему, меропенему. В отобранных образцах методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-тест систем ООО НПФ «Литех») были обнаружены гены бета-лактамаз: *bla*_{CTX-M-like} (72/104, 69,2%), *bla*_{NDM} (6/104, 5,8%), *bla*_{VIM} (49/104, 47,1%) и *bla*_{OXA48-like} (59/104, 56,7%). Выявлена корреляция между фенотипом устойчивости *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* к цефотаксиму и карбапенемным антибиотикам и выявлением генов *bla*_{CTX-M-like} и *bla*_{NDM}. В то же время до 70% *K.pneumoniae*, выделенных из биологических образцов, положительных на наличие генов карбапенемаз *bla*_{VIM} и *bla*_{OXA48-like} демонстрировали фенотипическую чувствительность к карбапенемам. Полученные результаты подтверждают прогностические возможности генетической диагностики для улучшения традиционного бактериологического исследования.

Ключевые слова: гемокультуры, бронхоальвеолярный лаваж, генетические маркеры резистентности, ПЦР-тестирование.

Fifteen specimens of the hemoculture and 89 specimens of the broncho-alveolar lavage were used in the study. Monocultures of gramnegative bacteria resistant to cefotaxime, ceftazidime, imipenem and meropenem were isolated from the specimens. The PCR method with detection of the results in the real time regimen (PCR test-system Litekh) provided detection of the beta-lactamase genes: *bla*_{CTX-M-like} (72/104, 69.2%), *bla*_{NDM} (6/104, 5.8%), *bla*_{VIM} (49/104, 47.1%) and *bla*_{OXA48-like} (59/104, 56.7%). There was identified correlation between the phenotype of resistance of *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* to cefotaxime and carbapenems and detection of the *bla*_{CTX-M-like} and *bla*_{NDM} genes. At the same time, up to 70% of the *K.pneumoniae* isolates from the biological specimens positive with respect to the presence of the carbapenase *bla*_{VIM} and *bla*_{OXA48-like} genes demonstrated their phenotypic susceptibility to carbapenems. The results of the study confirmed the prognostic value of the genetic diagnosis for improvement of the routine bacteriological investigations.

Key words: hemocultures, broncho-alveolar lavage, genetic markers of resistance, PCR method.

Введение

Одной из ведущих проблем современного здравоохранения, во многом обусловленной интенсивным применением антибактериальных препаратов, является формирование лекарственной устойчивости у возбудителей как внебольничных, так и особенно внутрибольничных ин-

фекций. Лечение таких инфекций требует больших затрат в связи с увеличением времени пребывания больного в стационаре и использованием дорогостоящих препаратов.

Современные принципы лечения жизнеугрожающих инфекций предусматривают незамедлительное назначение антибактериальных препаратов после установления диагноза [1]. В подавляющем большинстве случаев выбор препаратов происходит в условиях практически полного отсутствия информации об этиологии

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119435, Москва, Пироговская М. ул., 1, стр. 3. НПФ Литех

инфекционного процесса и антибиотикочувствительности возбудителя. На протяжении многих лет основу эмпирической терапии тяжёлых бактериальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, составляли и составляют бета-лактамы антибиотиков. Однако эффективность указанных препаратов ограничивается формированием приобретённой микробной резистентности, ведущим механизмом которой у грамотрицательных бактерий являются бета-лактамазы.

Бета-лактамазы представляют собой обширную и крайне разнообразную по своим свойствам группу ферментов [2], но основное клиническое значение имеет их относительно небольшое количество. Появление и распространение отдельных групп бета-лактамаз чётко связано с внедрением в медицинскую практику новых бета-лактамов антибиотиков. Так, вслед за внедрением аминопенициллинов и других полусинтетических пенициллинов у грамотрицательных бактерий появились и быстро распространились плазмидные бета-лактамазы класса А широкого спектра. Вслед за оксиминоцефалоспорином появились бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) [3]. Именно с распространением этих ферментов связано снижение эффективности цефалоспориновых антибиотиков I—IV поколений. Если до середины 90-х годов прошлого века среди БЛРС доминировали TEM- и SHV-типы, то в последующие годы они были постепенно вытеснены ферментами CTX-M-типа [4]. Ферменты CTX-M-типа доминируют среди БЛРС и на территории Российской Федерации [5].

Снижение эффективности цефалоспоринов привело к существенному увеличению потребления карбапенемных антибиотиков, что в свою очередь послужило толчком к формированию и распространению микробной резистентности к карбапенемам. Ведущую роль в распространении резистентности к карбапенемам играют четыре группы карбапенемаз: KPC-, VIM-, NDM- и OXA-48 типов [6]. По экспертным оценкам к маю 2015 г. в 13 из 38 стран Европы сформировались эндемичные очаги распространения продуцентов карбапенемаз, в большинстве остальных стран было отмечено региональное распространение этих бактерий, причём по сравнению с 2013 г. ситуация в большинстве стран существенно ухудшилась [7]. Основные глобально распространённые карбапенемазы выявлены и в Российской Федерации [8].

Широкое распространение БЛРС и появление карбапенемаз вызывает потребность в быстром выявлении указанных механизмов устойчивости, однако решение этой проблемы культуральными методами классической микробиологии невозможно. Одним из наиболее реаль-

ных подходов к решению указанной проблемы может быть детекция генов, кодирующих БЛРС и карбапенемазы, непосредственно в клиническом материале, минуя стадию выделения возбудителя в чистую культуру.

В настоящем исследовании продемонстрирована возможность прогнозирования лекарственной устойчивости путём обнаружения методом ПЦР наиболее распространённых генов резистентности, определяющих устойчивость микроорганизмов к цефалоспорином I—IV поколения и карбапенемам, в различном клиническом материале.

Материал и методы

Биологический материал. В исследование вошли 15 образцов гемокультуры и 89 образцов бронхоальвеолярного лаважа, полученных в период с августа 2013 г. по февраль 2014 г. Включение клинических образцов в экспериментальную выборку проводили согласно следующим критериям: присутствие в клиническом материале грамотрицательных бактерий в виде монокультуры; фенотипическая устойчивость выделенных бактерий к цефотаксиму, цефепиму, имипенему и меропенему.

Микробиологические исследования. Видовую идентификацию возбудителей в образцах проводили стандартными бактериологическими методами. Чувствительность к антибиотикам выявленных патогенных микроорганизмов определяли диско-диффузионным методом и интерпретировали в соответствии со стандартами EUCAST [9]. С учётом рода выделенного штамма определение чувствительности проводили к следующим антимикробным препаратам: цефотаксим, цефепим, имипенем, меропенем.

ПЦР исследование. Образцы ДНК выделяли согласно соответствующим методикам для бронхоальвеолярного лаважа и гемокультуры с использованием реагента «ДНК-экспресс» без красителя для флуоресцентных методов детекции (ООО НПФ «Литех», № ФСР 2007/00362).

Выделенные образцы ДНК анализировали с использованием экспериментальных диагностических наборов производства ООО НПФ «Литех» для выявления:

- резистентности к карбапенемам — Enterobacteriaceae и *Pseudomonas* (выявление генов VIM);
- резистентности к карбапенемам — Enterobacteriaceae и *Pseudomonas* (выявление генов NDM);
- резистентности к карбапенемам — Enterobacteriaceae и *Pseudomonas* (выявление генов OXA-48);
- резистентности к карбапенемам — Enterobacteriaceae и *Pseudomonas* (выявление генов KPC);
- резистентности к цефалоспорином — Enterobacteriaceae (выявление генов CTX-M).

Тестирование проводилось согласно рекомендациям производителя методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение

В ходе испытаний были проанализированы 104 клинических образца, полученных от пациентов различных отделений НИИ СП им. Н. В. Склифосовского. Отобранный клинический материал после микробиологического исследования и поступал в лабораторию ПЦР для выделения ДНК и тестирования на наличие генетических маркёров резистентности.

На основании бактериологических данных была проведена оценка видового разнообразия

Результаты бактериологического анализа чувствительности

Антибиотики	Фенотипы	<i>Acinetobacter</i> spp. (n=46)	<i>K.pneumoniae</i> (n=39)	<i>P.aeruginosa</i> (n=16)	<i>E.coli</i> (n=3)
Карбапенемы	чувствительные	4 (8,7%)	27 (69,2%)	3 (18,7%)	3 (100,0%)
	промежуточные	1 (2,2%)	5 (12,8%)	1 (6,3%)	0
	резистентные	41 (89,1%)	7 (18,0%)	12 (75,0%)	0
Цефотаксим	чувствительные	0	5 (12,8%)	0	1 (33,3%)
	резистентные	46 (100,0%)	34 (87,2%)	16 (100,0%)	2 (66,7%)
Цефепим	чувствительные	1 (2,2%)	13 (33,3%)	4 (25,0%)	1 (33,3%)
	резистентные	45 (97,8%)	26 (66,7%)	12 (75,0%)	2 (66,7%)

возбудителей, выявленных в клинических образцах. Микробный пейзаж представлен следующими видами: *Acinetobacter* spp. (46/104, 44%), *Klebsiella pneumoniae* (39/104, 38%), *Pseudomonas aeruginosa* (16/104, 15%) и *Escherichia coli* (3/104, 3%).

По результатам микробиологического анализа на чувствительность к цефалоспорином и карбапенемам бактериальные культуры были отнесены к трём фенотипическим группам:

- чувствительные к исследуемым антибиотикам;
- резистентные, обладающие устойчивостью к тестируемым препаратам, а также, в случае карбапенемов, показывающие промежуточную чувствительность к одному из карбапенемов на фоне устойчивости к другому;
- с промежуточной чувствительностью к препаратам, а также, в случае карбапенемов, чувствительные к одному из карбапенемов на фоне устойчивости к другому.

Результаты бактериологического определения чувствительности выявленных возбудителей к цефалоспорином и карбапенемам представлены в табл. 1. Согласно полученным данным, большинство штаммов *Acinetobacter* spp. и *P.aeruginosa* обладали резистентным к цефалоспорином и к карбапенемам фенотипом. В отношении штаммов *K.pneumoniae* и *E.coli* карбапенемы продемонстрировали высокую активность.

В предоставленной коллекции, состоящей из 104 клинических образцов, были обнаружены носители следующих генов резистентности: *bla*_{CTX-M-like} (72/104, 69,2%), *bla*_{NDM} (6/104, 5,8%), *bla*_{VIM} (49/104, 47,1%) и *bla*_{OXA48-like} (59/104, 56,7%). Гены *bla*_{KPC} в клинических образцах обнаружены не были.

Вследствие того, что генетические маркёры резистентности ассоциированы с различными фенотипами лекарственной устойчивости, сопоставление результатов бактериологического и ПЦР исследования проводили отдельно для каждого класса антимикробных препаратов.

Цефалоспорины. Согласно бактериологическим данным, из образцов, положительных по ге-

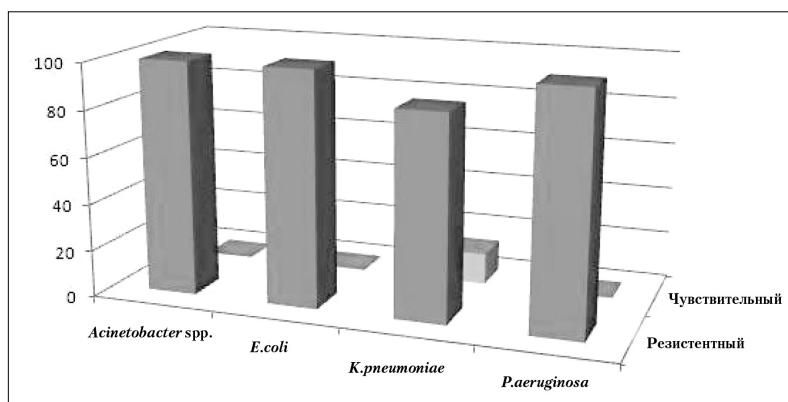


Рис. 1. Распределение штаммов бактерий, изолированных из положительного по гену *bla*_{CTX-M-like} клинического материала, по фенотипам чувствительности к цефотаксиму (в %).

ну *bla*_{CTX-M-like} (n=72), были выделены следующие возбудители: *Acinetobacter* spp. (27/72, 37,5%), *K.pneumoniae* (38/72, 52,8%), *P.aeruginosa* (5/72, 6,9%) и *E.coli* (2/72, 2,8%). Все штаммы *Acinetobacter* spp., *P.aeruginosa* и *E.coli*, изолированные из данных образцов, были фенотипически устойчивы к цефотаксиму. Среди штаммов *K.pneumoniae* преобладали резистентные к цефотаксиму (33/38, 86,8%) (рис. 1).

Обнаружение гена *bla*_{CTX-M-like} среди фенотипически чувствительных образцов можно объяснить гетерогенностью исходной бактериальной популяции, в которой доля чувствительных штаммов превышает резистентные. В этом случае при культивировании в неселективных условиях возможно вытеснение резистентных штаммов за счёт преимущественного роста «дикий» популяции.

Из клинического материала, отрицательного по гену *bla*_{CTX-M-like} (n=32), были изолированы 1 штамм *K.pneumoniae*, 19 штаммов *Acinetobacter* spp. и 11 штаммов *P.aeruginosa*, фенотипически устойчивые к цефалоспорином, а также 1 чувствительный к цефотаксиму штамм *E.coli*. В данных образцах ПЦР исследованием были выявлены гены карбапенемаз, выработка которых обуславливает устойчивость микроорганизма ко всем классам бета-лактамовых антибиотиков, в том числе к цефалоспорином. В частности, частота обнаружения генетических маркёров карбапенемаз для об-

разцов, ассоциированных с монокультурой *K.pneumoniae*, составила 100,0% (1/1), для образцов с монокультурой *Acinetobacter* spp. — 73,7% (14/19), для образцов с монокультурой *P.aeruginosa* — 72,7% (8/11). В образце, бактериологически охарактеризованном как монокультура *E.coli*, детерминант резистентности обнаружено не было.

Результат сопоставления данных бактериологического и ПЦР исследований свидетельствует о хорошей корреляции между фенотипом устойчивости *Acinetobacter* spp., *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* и *E.coli* к цефотаксиму и обнаружением в клиническом материале генетических детерминант цефалоспоринов и карбапенемаз, обуславливающих устойчивость к цефалоспоринов I–IV поколений.

Карбапенемы. Генетические маркеры резистентности к карбапенемам суммарно были выявлены в 76 образцах (76/104, 73%), из которых были изолированы монокультуры *K.pneumoniae* (32/76, 42,1%), *Acinetobacter* spp. (32/76, 42,1%) и *P.aeruginosa* (12/76, 15,8%). Гены *bla_{NDM}* были обнаружены в 6 образцах, в которых микробиологическими методами были выявлены *K.pneumoniae* (2/6), *Acinetobacter* spp. (3/6) и *P.aeruginosa* (1/6), устойчивые ко всем тестируемым карбапенемам (рис. 2).

Гены *bla_{VIM}* были обнаружены в 49 образцах, из которых в 22 образцах бактериологически определялся *Acinetobacter* spp., в 19 — *K.pneumoniae* и в 8 — *P.aeruginosa*. Среди изолированных из клинического материала, положительного по гену *bla_{VIM}*, штаммов *Acinetobacter* spp. и *P.aeruginosa*, преобладали возбудители с резистентным к карбапенемам фенотипом (86,4 и 75,0% штаммов соответственно), однако, среди выделенных *K.pneumoniae* только 15,8% были резистентны к имипенему и к меропенему (рис. 3).

Гены *bla_{OXA48-like}* были обнаружены в 59 образцах, из которых микробиологическими методами были изолированы *Acinetobacter* spp. (27/59), *K.pneumoniae* (27/59) и *P.aeruginosa* (5/59). Фенотипически устойчивыми к карбапенемам оказалась большая часть штаммов *Acinetobacter* spp. и *P.aeruginosa* (88,9 и 60,0% штаммов, соответственно), в то время как среди штаммов *K.pneumoniae* преобладали чувствительные к тестируемым карбапенемам (70,4% штаммов) (рис. 4).

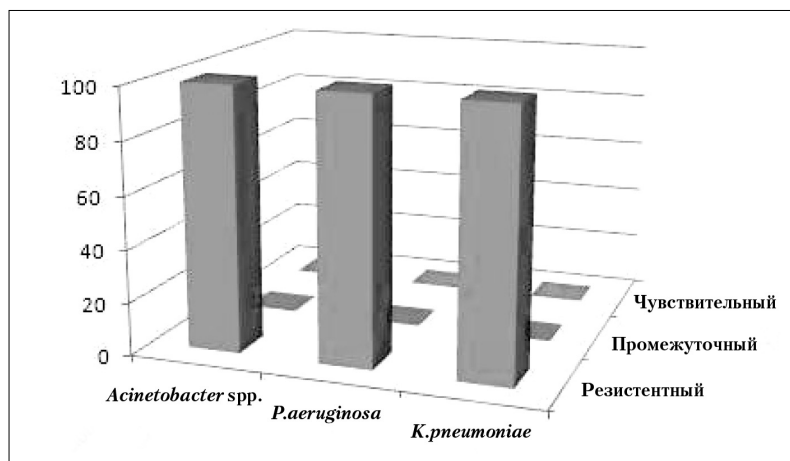


Рис. 2. Распределение штаммов бактерий, изолированных из положительного по гену *bla_{NDM}* клинического материала, по фенотипам чувствительности к карбапенемам (в %).

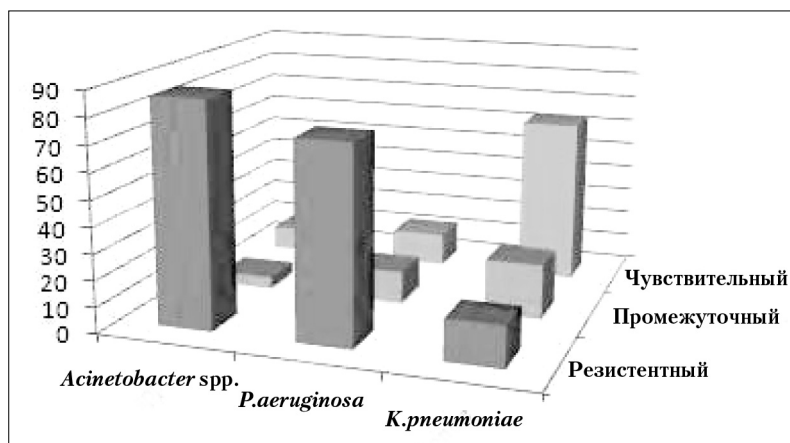


Рис. 3. Распределение штаммов бактерий, изолированных из положительного по гену *bla_{VIM}* клинического материала, по фенотипам чувствительности к карбапенемам (в %).

Таким образом, в случае *Acinetobacter* spp. и *P.aeruginosa* наблюдалась хорошая корреляция между фенотипом выделенных бактериальных культур и обнаружением генетических маркеров резистентности в исходном клиническом материале. Однако, фенотип изолированных штаммов *K.pneumoniae* плохо коррелировал с обнаружением генов *bla_{VIM}* и *bla_{OXA48-like}*.

Возможны две основные причины несоответствия между фенотипической чувствительностью к карбапенемам патогенов, выделенных из биологических образцов, и наличия в образцах генов карбапенемаз. Одной из них может быть низкий уровень экспрессии генов, который не обеспечивал фенотипически выявляемую устойчивость. Низкие значения МПК карбапенемов часто выявляются у бактерий, продуцирующих карбапенемазы группы ОХА-48 [10]. Возможно также наличие в биологических образцах, положительных

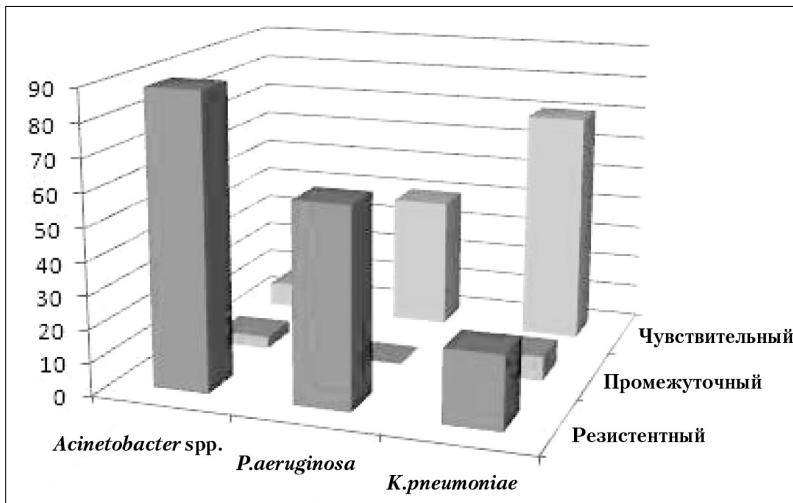


Рис. 4. Распределение штаммов бактерий, изолированных из положительного по гену *bla*_{OXA48-like} клинического материала, по фенотипам чувствительности к карбапенемам (в %).

на гены карбапенемазы, бактерий, которые не удалось выделить при традиционном культивировании. Для подтверждения данной гипотезы исходные *bla*_{VIM}- и *bla*_{OXA48-like}-положительные образцы, из которых были получены чувствительные к карбапенемам штаммы *K.pneumoniae* в виде монокультуры ($n=22$), дополнительно были протестированы набором «Септоскрин» (ООО НПФ «Литех», № ФСР 2012/13945), позволяющем обнаружить наиболее часто встречаемых возбудителей инфекций в стационарах методом ПЦР. Согласно полученным результатам в 95,5% (21/22), случаях в тестируемых образцах детектировалась ДНК *P.aeruginosa*. На основании этих данных мы можем предположить, что носителем регистрируемых в клиническом материале генов *bla*_{VIM} и *bla*_{OXA48-like} является *P.aeruginosa*. Распространение *P.aeruginosa*, продуцирующих VIM-2 карбапенемазы характерно для Российской Федерации и ряда соседних стран [11].

Клинические критерии антибиотикочувствительности, разработанные на основании данных о фармакокинетики и фармакодинамике антибактериальных препаратов ведущими международными профессиональными организациями (EUCAST [9] и CLSI [12]), позволяют достаточно надёжно прогнозировать результат терапии на основании значений МПК или зон задержки роста. Несмотря на то что значимость детекции генов антибиотикорезистентности для прогнозирования исходов терапии гораздо менее очевидна, направление по детекции генов резистентности в различных биологических образцах интенсивно развивается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S.M., Sevransky J.E., Sprung C.L., Douglas I.S., Jaeschke R. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med 2013; 41: 2: 580–637.

В настоящее время производителями предлагаются различные подходы для повышения информативности традиционных микробиологических методов, при этом наибольший интерес представляют генетические методы благодаря возможности предсказывать клиническую эффективность антибиотиков, анализируя непосредственно клинический материал [13]. В последние годы появились целые серии коммерческих продуктов, основанных на различных модификациях ПЦР или микрочиповых технологиях, предназначенных для детекции в крови и других стерильных жидкостях наиболее актуальных генетических маркеров резистентности [14–16]. Результаты испытаний таких систем в европейских лабораториях свидетельствуют о высокой чувствительности

данных методик и возможности быстрого и точного предсказания фенотипа резистентности микроорганизмов [17–19].

Результаты испытаний ПЦР-тест-систем ООО НПФ «Литех» подтверждают прогностические возможности генетической диагностики для улучшения традиционного бактериологического исследования. Патогенные микроорганизмы, выделенные из образцов гемокультуры и бронхоальвеолярного лаважа, положительных на наличие генетических маркеров резистентности, показывали ожидаемый фенотип устойчивости, в частности в случае устойчивых к цефалоспорином штаммов *K.pneumoniae* и устойчивых к карбапенемам штаммов *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. Выявление в образцах биологического материала, положительных на продукцию *bla*_{VIM} и *bla*_{OXA48-like}, фенотипически чувствительных изолятов *K.pneumoniae* требует дальнейшего изучения.

В настоящем исследовании продемонстрирован потенциал применения ПЦР-детекции генетических маркеров резистентности как дополнительного инструмента тестирования при бактериологических исследованиях, способствующего повышению информативности исследования и позволяющего прогнозировать устойчивость возбудителей к антибиотикам.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-00563).

2. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of {beta}-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 3: 969–976.
3. Lynch J.P., 3rd, Clark N.M., Zhanel G.G. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases). Expert Opin Pharmacother 2013; 14: 2: 199–210.

4. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Ayala J., Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F. et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 2: 165–174.
5. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Strachounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 12: 3724–3732.
6. Canton R., Akova M., Carmeli Y., Giske C.G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D.M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G.M. et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 5: 413–431.
7. Albiger B., Glasner C., Struelens M., Grundmann H., Monnet D., group tESoC-PEEW. May 2015. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries. *Euro Surveill* 2015; 20 (45): pii=30062 DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917ES.2015.20.45.30062> 2015.
8. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 2: 152–155.
9. Hakenbeck R., Martin C., Dowson C., Grebe T. Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. *J Bacteriol* 1994; 176: 17: 5574–5577.
10. Oueslati S., Nordmann P., Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 4: 1059–1063.
11. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'Souza J. W., Tapalski D.V., Azizov I.S., Sukhorukova M.V., Pavlukov R.A., Kozlov R.S., Toleman M.A. et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 10: 867–876.
12. CLSI.: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. In. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
13. Lupo A., Papp-Wallace K.M., Sendi P., Bonomo R.A., Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77: 3: 179–194.
14. Cuzon G., Naas T., Bogaerts P., Glupczynski Y., Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 8: 1865–1869.
15. Avlami A., Bekris S., Ganteris G., Kraniotaki E., Malamou-Lada E., Orfanidou M., Paniara O., Pantazatou A., Papagiannitis C.C., Platsouka E. et al. Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods* 2010; 83: 2: 185–187.
16. Cuzon G., Naas T., Bogaerts P., Glupczynski Y., Nordmann P. Probe ligation and real-time detection of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 4: 502–505.
17. Spanu T., Fiori B., D'Inzeo T., Canu G., Campoli S., Giani T., Palucci I., Tumbarello M., Sanguinetti M., Rossolini G.M. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (blaKPC). *J Clin Microbiol* 2012; 50: 8: 2783–2785.
18. Willemsen I., Hille L., Vrolijk A., Bergmans A., Kluytmans J. Evaluation of a commercial real-time PCR for the detection of extended spectrum beta-lactamase genes. *J Med Microbiol* 2014, 63: Pt 4: 540–543.
19. Uno N., Suzuki H., Yamakawa H., Yamada M., Yaguchi Y., Notake S., Tamai K., Yanagisawa H., Misawa S., Yanagihara K. Multicenter evaluation of the Verigene Gram-negative blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants in positive blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 83: 4: 344–348.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лисицына Евгения Сергеевна — научный сотрудник ООО «Научно-производственная фирма ЛИТЕХ», Москва

Черненькая Татьяна Витальевна — к.м.н., руководитель отдела клинической микробиологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва

Ильина Елена Николаевна — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва

Лазарева Ирина Владимировна — научный сотрудник, отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпиде-

миологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Агеевец Владимир Андреевич — младший научный сотрудник, отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Сидоренко Сергей Владимирович — д.м.н., профессор, заведующий отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Антибиотикорезистентность коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в стационарах Санкт-Петербурга и Москвы

В. В. ГОСТЕВ¹, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ¹, А. Н. КРУГЛОВ², С. В. СИДОРЕНКО¹

¹ НИИ детских инфекций Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

² Национальное агентство по клинической фармакологии и фармации, Москва

Antibiotic Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated at Hospitals of St. Petersburg and Moscow

V. V. GOSTEV, O. S. KALINOGORSKAYA, A. N. KRUGLOV, S. V. SIDORENKO

Research Institute of Children's Infections, Federal Medico-Biological Agency, St. Petersburg

National Agency for Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow

Изучена антибиотикочувствительность 119 изолятов коагулазоотрицательных стафилококков (CoNS — coagulase-negative staphylococci), выделенных в лечебных учреждениях Санкт-Петербурга и Москвы и расцененных в местных лабораториях как устойчивые к оксациллину. Были идентифицированы следующие виды: *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.capitis*, *S.simulans*, *S.pettenkoferi*, *S.lentus*, *S.carnosus*, *S.warneri*, устойчивость к оксациллину подтверждена у 79,8% изолятов. Частота ассоциированной устойчивости к не бета-лактамам антибиотикам была существенно выше у оксациллиноустойчивых изолятов в сравнении с оксациллиночувствительными. При использовании критериев чувствительности CLSI и EUCAST показатели устойчивости различались на 1—3%. Среди оксациллиноустойчивых изолятов частота устойчивости к гентамицину, ципрофлоксацину, эритромицину, моксифлоксацину, тетрациклину и клиндамицину составляла 90, 88, 88, 63, 43 и 26% соответственно. Обнаружено два изолята *S.epidermidis*, устойчивых к линезолиду и проявивших сниженную чувствительность к тедизолиду, восемь изолятов проявляли сниженную устойчивость к мупироцину. МПК цефтаролина в отношении оксациллиноустойчивых CoNS варьировала от 0,5 до 2,0 мкг/мл, а в отношении чувствительных — была ниже 0,25 мкг/мл. Устойчивости к тигециклину и ванкомицину выявлено не было.

Ключевые слова: коагулазоотрицательные стафилококки, антибиотикорезистентность.

Antibiotic susceptibility of 119 coagulase-negative staphylococci isolated at hospitals of St. Petersburg and Moscow was investigated and estimated at the local laboratories as oxacillin resistant. The following species were identified: *Staphylococcus epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S. hominis*, *S.capitis*, *S.simulans*, *S.pettenkoferi*, *S.lentus*, *S.carnosus* and *S.warneri*. The oxacillin resistance was confirmed in 79.8% of the isolates. The frequency of the associated resistance to non-beta-lactams was much higher in the oxacillin resistant isolates vs. the oxacillin susceptible ones. When the CLSI and EUCAST susceptibility criteria were used, 1—3% difference in the resistance levels was recorded. Among the oxacillin resistant isolates the frequency of resistance to gentamicin, ciprofloxacin, erythromycin, moxifloxacin, tetracycline and clindamycin equaled 90, 88, 88, 63, 43 and 26% respectively. Two linezolid resistant isolates of *S.epidermidis* with lower susceptibility to tedizolid were isolated. Eight isolates of *S.epidermidis* showed lower resistance to mupirocin. The MIC of ceftarolin for oxacillin resistant coagulase-negative staphylococci varied from 0.5 to 2.0 mcg/ml, while for the oxacillin susceptible ones it was lower than 0.25 mcg/ml. No resistance to tigecyclin and vancomycin was observed.

Key words: coagulase-negative staphylococci, antibiotic resistance.

Введение

Выделение в пределах рода *Staphylococcus* группы «коагулазоотрицательные стафилококки» (CoNS — coagulase-negative staphylococci) было предложено в начале 40-х годов прошлого века, оно основано на единственном признаке — продукции фермента коагулазы, который не учитывает другие характеристики бактерий и филогенетические связи внутри рода [1]. Несмотря на то

что современные представления о таксономии стафилококков существенно изменились, признак продукции коагулазы остается важнейшим в клинико-эпидемиологической классификации этих бактерий [2]. В последние годы представления о видовом разнообразии стафилококков быстро меняются благодаря описанию новых видов, часть CoNS входят в состав нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека (*S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.warneri*, *S.xylois*, *S.capitis*, *S.simulans*, *S.pettenkoferi* и др.), другие характерны для животных и редко встре-

© Коллектив авторов, 2015

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

чаются у человека (*S.carnosus*, *S.lentus*, *S.caprae*, *S.felis* и др.).

Все перечисленные CoNS традиционно и совершенно обоснованно рассматриваются как комменсалы, однако широкое распространением инвазивных медицинских технологий и изменение структуры пациентов (увеличение числа иммунокомпрометированных пациентов и пациентов экстремальных возрастных групп) привели к изменению клинического значения этих бактерий. В настоящее время CoNS являются основными возбудителями инфекций, связанных внутрисосудистыми устройствами и имплантатами. Эти инфекции преимущественно распространены среди пациентов отделений реанимации, неонатологии, трансплантологии, ожоговых, учреждений травматолого-ортопедического профиля.

Широкое распространение инфекций, вызываемых CoNS, естественно делает актуальной проблему их лечения. Сложности лечения указанных инфекций связаны с высокой частотой распространения среди CoNS метициллинорезистентности [3], являющейся маркером устойчивости к большинству бета-лактамов антибиотиков, а также ассоциированной устойчивости к антибиотикам других групп. Традиционно средством выбора для лечения инфекций, вызванных метициллинорезистентными изолятами, считались гликопептидные антибиотики, прежде всего ванкомицин. Однако в последнее время сформировалось представление о недостаточной эффективности ванкомицина при инфекциях, вызываемых изолятами с МПК $\geq 2,0$ мкг/мл. В качестве альтернатив ванкомицину рассматривают ряд новых антибиотиков линезолид, даптомицин, цефтаролин, тигециклин, тедизолид, а также комбинации таких хорошо известных антибиотиков как рифампицин и ко-тримоксазол. При инфекциях кожи и мягких тканей возможно местное применение мупироцина или фузидиевой кислоты.

Частота устойчивости CoNS, циркулирующих на территории России, изучена недостаточно. С определёнными сложностями связано и выявление метициллинорезистентности среди CoNS, поскольку критерии чувствительности *S.aureus*, предлагаемые EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing — Европейский комитет по оценке антибиотикочувствительности) [4], отличаются от таковых рекомендуемых CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution — Институт клинических и лабораторных стандартов) [5].

Цель настоящей работы — оценка достоверности детекции метициллинорезистентности среди CoNS, выделенных в лечебных учреждениях Москвы и Санкт-Петербурга, а также оценка чувствительности этих изолятов к широкому кругу антибактериальных препаратов.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. В исследование были включены неповторяющиеся изоляты метициллинорезистентных CoNS ($n=119$), выделенные от больных с разными формами инфекций. Изоляты были получены в 2011—2014 г. из нескольких стационаров Санкт-Петербурга и Москвы. После доставки центральную лабораторию проверяли чистоту культур полученных изолятов, проводили их повторную идентификацию и оценку антибиотикочувствительности.

Идентификацию суточных культур, выращенных на кровяном агаре, проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре MicroflexLT (BrukerDaltonics, Германия). В лаборатории НИИДИ изоляты депонировались в музей культур и хранились при -70°C в 3% Колумбийском агаре («bioMérieux», Франция) с 30 об.% глицерина.

Оценка антибиотикочувствительности. Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в бульоне Cation-Adjusted MuellerHinton (CAMH) II Broth («Becton Dickinson», США) в соответствии с протоколами CLSI [5] от 2014 и EUCAST версия 5.0 [4]. Были использованы следующие субстанции антибиотиков («Molekula», Англия): оксациллин (OXA), цефокситин (FOX), гентамицин (GEN), эритромицин (ERY), клиндамицин (CLI), ципрофлоксацин (CIP), моксифлоксацин (MFX), тетрациклин (TCY), мупироцин (MUP), фузидиевая кислота (FUS), триметоприм/сульфаметоксазол (SXT), ванкомицин (VAN), рифампицин (RIF). Антибиотики других производителей: линезолид (LNZ) и тигециклин (TGC, Pfizer, США), цефтаролин (CPT, AstraZeneca, Англия), тедизолид (TDZ, Bayer, Германия). Постановку опыта проводил в 96-луночных планшетах (НПО «Медполимер», Санкт-Петербург). В качестве контрольной культуры был использован штамм *S.aureus* ATCC 29213 (Culti-loops Remel, США). Критерии чувствительности CoNS для метода серийных разведений предлагаемые CLSI [5] и EUCAST версия 5.0 [4] приведены в табл. 1.

Анализ и статистическая обработка данных. Обработку результатов осуществляли на платформе WHONET ver 5.6, рассчитывали следующие параметры: распределение и диапазон МПК, МПК₅₀, МПК₉₀, среднегеометрическая МПК (МПК_Г), количество и процент чувствительных изолятов (S), устойчивых (R), с промежуточной чувствительностью (I). В качестве критериев оценки клинической устойчивости/чувствительности (clinical breakpoint) использовали стандарты CLSI 2014 и EUCAST ver. 5.0. (2015). Для оценки микробиологической резистентности был использован критерий epidemiological cut-off (ECOFF) в соответствии с EUCAST.

Результаты и обсуждение

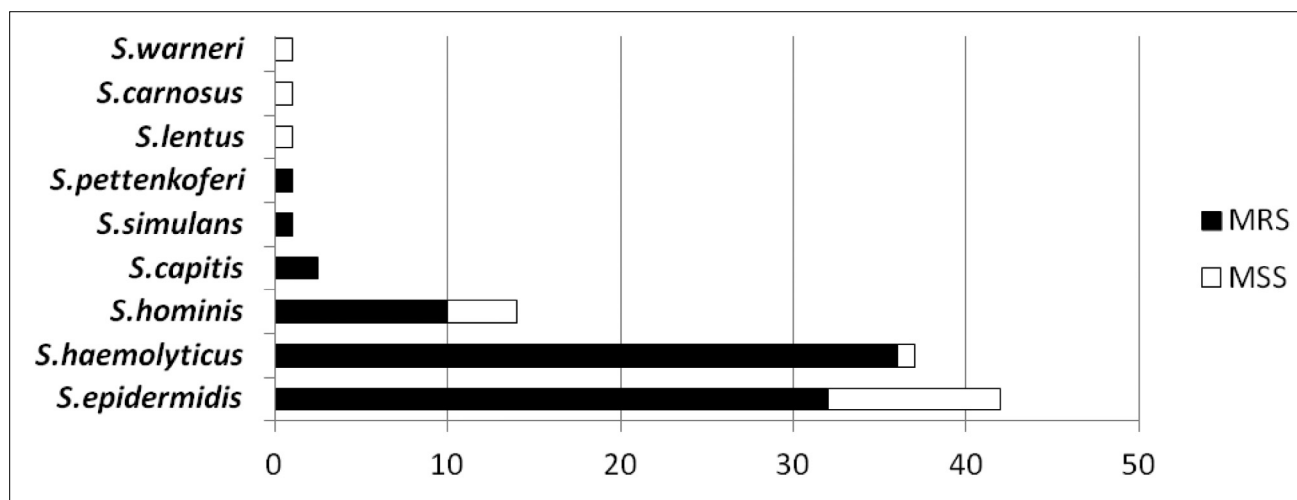
Изоляты, включённые в исследование, были выделены из крови при сепсисе — 61%, из хирургических ран — 19%, из мокроты — 7% и других источников (носоглоточные мазки, инфекции кожи, моча и др.) — 13%. По результатам идентификации было выявлено 9 видов: *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.capitis*, *S.simulans*, *S.pettenkoferi*, *S.lentus*, *S.carnosus*, *S.warneri*, со значительным преобладанием первых двух видов (рисунок).

Установлено, что из 119 изолятов, оцененных в лабораториях лечебных учреждений как метициллинустойчивые, 24 (20,2%) оказались метициллинчувствительными, в том числе все изоляты *S.warneri*, *S.carnosus* и *S.lentus*; 28,6% изолятов *S.hominis*, 23,8% — *S.epidermidis* и 2,8% —

Таблица 1. Критерии оценки чувствительности к антибиотикам у коагулазоотрицательных стафилококков при использовании метода серийных разведений

Антибиотик	CLSI 2014, МПК, мкг/мл			EUCAST v. 5,0, МПК, мкг/мл	
	S≤	I	R>	S≤	R>
Оксациллин	0,25	—	0,5	0,25	0,25
Эритромицин	0,5	1—4	8	1	2
Ципрофлоксацин	1	2	4	1	1
Гентамицин	4	8	16	1	1
Моксифлоксацин	0,5	1	2	0,5	1
Ко-тримоксазол ¹	2	—	4	2	4
Тетрациклин	4	8	16	1	2
Рифампицин	1	2	4	0,06	0,5
Клиндамицин	0,5	1—2	4	0,25	0,5
Фузидиевая кислота ²	—	—	—	1	1
Линезолид	4	—	8	4	4
Тедизолид ²	—	—	—	0,5	0,5
Ванкомицин	4	8—16	32	4	4
Тигециклин ²	—	—	—	0,5	0,5
Мупироцин ⁴	—	—	—	—	—
Цефтаролин ⁴	—	—	—	—	—
Цефокситин ³	ДДМ			ДДМ	

Примечание. S — чувствительные штаммы; I — штаммы с промежуточной чувствительностью; R — устойчивые штаммы. ¹ — границы указаны относительно концентрации триметоприма; ² — для фузидиевой кислоты, тигециклина и тедизолида критерии в CLSI не представлены (2014); ³ — чувствительность к цефокситину у CoNS определяется диско-диффузионным методом; ⁴ — границы чувствительности/устойчивости для мупироцина и цефтаролина для CoNS не определены (определены только для *S.aureus*).



Распределение видов CoNS по чувствительности к оксациллину.

S.haemolyticus. Все изоляты *S.pettenkoferi* *S.simulans* и *S.capitis* проявляли метциллинорезистентность (см. рис. 1).

Оксациллинорезистентные CoNS. Результаты оценки чувствительности CoNS с подтвержденной устойчивостью к оксациллину и распределение МПК изученных антибиотиков приведены в табл. 2. Все изоляты, устойчивые к оксациллину имели широкий диапазон МПК цефокситина (1—512 мкг/мл). Следует отметить, что в настоящее время ни CLSI, ни EUCAST не предлагает критериев чувствительности CoNS к большинству бета-лактамов для метода серийных разведений, более того, EUCAST указывает, что величина МПК цефокситина менее

достоверно прогнозирует оксациллинорезистентность в сравнении с диско-диффузионным методом. Однако анализ полученных данных свидетельствует, что между МПК оксациллина и цефокситина в отношении оксациллинорезистентных CoNS отмечается значительная корреляция. Среднегеометрическое значение МПК цефокситина лишь не намного превосходит это значение для оксациллина.

Клинические критерии чувствительности CoNS к цефтаролину и эпидемиологическая точка отсечения не определены. В качестве фармакодинамически обоснованного видо-независимого критерия чувствительности к цефтаролину EUCAST предлагает МПК ≤0,5 мкг/мл [6]. При

Таблица 2. Характеристика антибиотикочувствительности CoNS (n=95), устойчивых к оксациллину

Антибиотик	МПК, мкг/мл										МПК ₅₀ , мкг/мл			МПК ₉₀ , мкг/мл			МПК _{сг} ¹ , мкг/мл			CLSI, %			EUCAST, %		
	≤0,016	0,03	0,06	0,12	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≤	МПК ₅₀ , мкг/мл	МПК ₉₀ , мкг/мл	МПК _{сг} ¹ , мкг/мл	S	I	R	S	I	R
Оксациллин					2	3	5	3	11	3	11	2	4	51			256	512	71	0	0	100	0	100	0
Цефокситин ⁴					1	1	1	1	5	11	12	11	12	41			128	512	92	—	—	—	—	—	—
Цефтаролин ⁴	6	14	23	25	27												1	2	0,7	—	—	—	—	—	—
Гентамицин		8		1	2	3	2	3	2	4	15	7	53				128	128	35	14	2	84	10	90	90
Ципрофлоксацин		10		1	4	9	23	14	14	13	5	2					16	64	10	12	4	84	12	88	88
Моксифлоксацин		11	3	21	32	15	10	2	1								2	8	2	15	22	63	15	63	63
Эритромицин		10		1	1	1	1	5	17	15	19	27					32	128	22	10,5	2,2	87	12	88	88
Клиндамицин		70		1	1	1	1	4	1	17							0,03	64	0,2	74	24	24	74	26	26
Тетрациклин	6	2	14	24	27	22	10	8	1	8	6	26					2	64	3	57	1	42	48	43	43
Тигециклин ³																	0,25	0,5	0,15	—	—	—	100	0	0
Ванкомицин					1	5	33	52	4								2	2	1,5	100	—	—	100	0	0
Линезолид					5	70	18			2							1	2	1,1	98	—	2	98	2	2
Тедизолид ³	4	1	18	34	35	1			2								0,125	0,25	0,13	—	—	—	98	2	2
Рифампицин	3	9	40	5	8			2	28								0,06	4	0,2	47	2	51	40	55	55
Ко-тримоксазол ²		4	16	7	4	10	12	8	34								4	16	3	43	13	44	43	44	44
Фузидиевая кислота ³	6	2	18	46	6	1		5	11								0,25	16	0,4	—	—	—	82	18	18
Мупиросин ⁴		1	2	12	25	45	2			8							1	2	0,8	—	—	—	—	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 3: ¹ — МПК_{сг} — среднее геометрическое значение МПК; ² — оценка чувствительности указана относительно триметоприма; ³ — для фузидиевой кислоты, тигециклина и тедизолида не представлены критерии в CLSI (2014); ⁴ — границы чувствительности/устойчивости для цефокситина, мупиросина и цефтаролина не определены.

Таблица 3. Характеристика антибиотикочувствительности CoNS (n=24), чувствительных к оксациллину

Антибиотик	МПК, мкг/мл										МПК ₅₀ , мкг/мл			МПК ₉₀ , мкг/мл			МПК _{сг} ¹ , мкг/мл			CLSI, %			EUCAST, %		
	≤0,016	0,03	0,06	0,12	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≤	МПК ₅₀ , мкг/мл	МПК ₉₀ , мкг/мл	МПК _{сг} ¹ , мкг/мл	S	I	R	S	I	R
Оксациллин					24												0,25	0,25	0,25	100	—	0	100	0	0
Цефокситин ⁴					1	3	10	9		1							2	4	2,4	—	—	—	—	—	—
Цефтаролин ⁴	22	1															0,03	0,03	0,03	—	—	—	—	—	—
Гентамицин					20	3	1										0,06	0,5	0,12	96	—	4	96	4	4
Ципрофлоксацин					22			1		1							0,12	0,12	0,17	92	—	8	92	8	8
Моксифлоксацин					23			1									0,06	0,06	0,07	92	—	8	92	8	8
Эритромицин					14	1			1	3	1						0,06	128	0,7	62	—	38	62	38	38
Клиндамицин					23					1							0,03	0,03	0,04	96	—	4	96	4	4
Тетрациклин					19	1	1		1	2							0,03	8	0,14	87	—	13	87	13	13
Тигециклин ³	9	8	2	2	3	1	15	8									0,03	0,25	0,03	—	—	—	100	0	0
Линезолид																	1	2	1,2	100	—	0	100	0	0
Тедизолид ³					3	6	12	1									0,25	0,25	0,14	—	—	—	100	0	0
Ванкомицин																	1	2	1,4	100	—	0	100	0	0
Рифампицин	3	4	17														0,06	0,06	0,04	100	—	0	100	0	0
Ко-тримоксазол ²		4	8	1	5	4				1	1						0,06	0,5	0,16	92	—	8	92	8	8
Фузидиевая кислота ³		3	1	12	5			1		2							0,25	4	0,4	—	—	—	87	13	13
Мупиросин ⁴					1	1	5	15	2								1	1	0,8	—	—	—	—	—	—

таком подходе более 50% изолятов будут попадать в категорию клинически нечувствительных. Вполне очевидно, что целесообразность применения цефтаролина в принятой в настоящее время дозировке при инфекциях, вызванных CoNS, нуждается в серьёзном обосновании. Было выявлено перекрёстное увеличение МПК к разным бета-лактамам антибиотикам. В частности, изоляты, имеющие высокие значения МПК к оксациллину (≥ 512 мкг/мл), также характеризовались высокими МПК цефокситина (≥ 512 мкг/мл) и цефтаролина (2 мкг/мл).

Высокая частота устойчивости (84 и 90% по CLSI и EUCAST соответственно) среди CoNS была отмечена к гентамицину (маркёру устойчивости ко всем аминогликозидам [7]), рифампицину и ко-тримоксазолу. Частота устойчивости к фторхинолонам также была высокой, однако для моксифлоксацина этот показатель был приблизительно на 20% ниже, чем для ципрофлоксацина. Значительные различия в частоте устойчивости отмечались и в группе макролидов — линкозамидов между эритромицином и клиндамицином также. Для эритромицина этот показатель составил 87–88%, а для клиндамицина 24–26%. Следует предположить, что среди CoNS превалирует механизм устойчивости, связанный с эффлюксом. Невысоким был уровень устойчивости к фузидиевой кислоте (18%).

К тетрациклину проявляли устойчивость 42–43% изолятов, а к новому производному тетрациклинов тигециклину все изоляты были чувствительны. Не был также выявлен изолятов, устойчивых к ванкомицину.

Из двух оксазолидинонов по таким показателям, как характер распределения МПК и её среднегеометрическое значение, тедизолид был значительно активнее линезолида. Два изолята *S.epidermidis* оказались устойчивыми к оксазолидинонам, при этом МПК линезолида была равна 32,0 мкг/мл, тедизолида — 4,0 мкг/мл. Критерии чувствительности CoNS к мупироцину и величина эпидемиологической точки отсечения для этого антибиотика не определены, в качестве ориентира можно использовать эпидемиологическую точку отсечения, предложенную EUCAST для *S.aureus* (1,0 мкг/мл). К настоящему времени описаны два механизма устойчивости к мупироцину, один из них опосредует низкий уровень (МПК от 8,0 до 256,0 мкг/мкл) и связан с мутациями в гене изолейцил-тРНК синтетазы, другой — высокий уровень (МПК ≥ 512 мкг/мл) и связан с наличием плазмидного гена (*mupA*), кодирующего дополнительную изолейцил-тРНК синтетазу с низкой чувствительностью к мупироцину [8]. Оценивая характер распределения МПК мупироцина, 8 изолятов следует оценить как проявляющие низкий уровень устойчивости (МПК 32,0 мкг/мл).

При анализе ассоциированной резистентности у CoNS выявлено 37 вариантов (профилей) резистентности к семи группам препаратов: фторхинолонам, гентамицину, ко-тримоксазолу, фузидиевой кислоте, макролидам, линкозамидам и рифампицину (для оценки использовали критерии EUCAST). Так, 15% изолятов проявляли ассоциированную устойчивость к 5 группам антибиотиков, и демонстрировали профиль резистентности: эритромицин — клиндамицин — ципрофлоксацин — моксифлоксацин — ко-тримоксазол — гентамицин, 9% демонстрировали профиль: эритромицин — клиндамицин — ципрофлоксацин — моксифлоксацин — ко-тримоксазол — гентамицин — рифампицин.

Оксациллиночувствительные CoNS. Результаты оценки чувствительности CoNS с подтверждённой чувствительностью к оксациллину и распределение МПК изученных антибиотиков приведены в табл. 3.

Особенностью чувствительности к бета-лактамам были относительно высокие значения МПК цефокситина (1–16,0 мкг/мл), при низких значениях МПК оксациллина и цефтаролина. В целом, оксациллиночувствительные CoNS проявляли существенно более низкий уровень ассоциированной устойчивости к антибиотикам различных групп в сравнении с оксациллинорезистентными. Наибольшая частота устойчивости была отмечена к эритромицину (38%), тетрациклину (13%) и к фузидиевой кислоте (13%). К гентамицину, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, клиндамицину и ко-тримоксазолу были устойчивы от 4 до 8% изолятов. Устойчивости к ванкомицину, линезолиду, тедизолиду и рифампицину выявлено не было. МПК мупироцина не превышала 2,0 мкг/мл.

Обсуждение результатов

Высокий процент ложноположительных результатов (20,2%), полученных в ходе настоящего исследования в ряде практических лабораторий, свидетельствует о том, что выявление оксациллинорезистентности среди CoNS представляет существенную проблему. Использование цефокситина для детекции метициллинорезистентности методом серийных разведений в отличие от диско-диффузионного метода не позволяет получить корректные результаты. Анализ распределения значений МПК к цефокситину показал, что среди оксациллиночувствительных изолятов МПК цефокситина лежало в «высоких» пределах (4–16 мкг/мл). И, наоборот, среди оксациллинорезистентных 3 изолята имели низкие значения МПК 1–4 мкг/мл. Это связано с тем, что у представителей CoNS более выражен феномен гетерорезистентности к бета-лактамам по сравнению с *S.aureus*. Эти данные согласуются с

результатами других авторов о «плавающих» значениях МПК цефокситина [9, 10].

В результате исследования также уточнены показатели активности в отношении CoNS нового цефалоспоринового антибиотика с анти-MRSA активностью — цефтаролина. Установлено, что цефтаролин существенно менее активен в отношении оксациллиноустойчивых изолятов, чем в отношении оксациллиночувствительных. Так, показатели МПК₅₀, МПК₉₀ и среднегеометрическая МПК составляют 1,0 мкг/мл, 2,0 мкг/мл и 0,7 мкг/мл против 0,03 мкг/мл, 0,03 мкг/мл и 0,03 мкг/мл. Следует признать, что при принятых в настоящее время режимах дозирования, цефтаролин при инфекциях, вызванных оксациллино-резистентными CoNS, скорее будет недостаточно эффективен.

К практически важным находкам следует отнести обнаружение изолятов *S.epidermidis*, устой-

чивых к линезолиду, важно отметить, что в отношении этих изолятов достаточно высокую МПК (4,0 мкг/мл) демонстрировал также новый оксазолидинон — тедизолид. Наиболее вероятно, что при выявленном фенотипе устойчивость может быть связана с мутациями в генах рибосомальных 23SРНК [11].

Восемь изолятов оксациллинорезистентных CoNS проявляли низкий уровень устойчивости к мупироцину. Несмотря на то что клиническое значение низкого уровня устойчивости не определено, выявленный факт следует расценивать как крайне негативный.

Уведомление: Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00185).

ЛИТЕРАТУРА

1. Fairbrother R.W. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. J Pathol Bacteriol 1940; 50; 1: 83—88.
2. Becker K., Heilmann C., Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clinical Microbiol Reviews 2014; 27: 4: 870—926.
3. Сидоренко С.В. и др. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге. Антибиотики и химиотер 1998; 43: 7: 15—25.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>.
5. CLSI. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2014. 2014.
6. Aguado J.M., Ponte C., Soriano F. Bacteriuria with a multiply resistant species of *Corynebacterium* (*Corynebacterium* group D2): an unnoticed cause of urinary tract infection. J Infect Dis 1987. 156: 1: 144—150.
7. Leclercq R. et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clinical Microbiol Infect 2013; 19: 2: 141—160.
8. Thomas C. M. et al. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin. Nature reviews. Microbiology, 2010; 8: 4: 281—289.
9. Swenson J.M. et al. Correlation of cefoxitin MICs with the presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 2009; 47: 6: 1902-1905.
10. Mencacci A. et al. Comparison of the BD Phoenix system with the cefoxitin disk diffusion test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2009; 47: 7: 2288—2291.
11. Tewhey R. et al. Mechanisms of linezolid resistance among coagulase-negative staphylococci determined by whole-genome sequencing. mBio 2014; 5: 3.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гостев Владимир Валерьевич — к.б.н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Калиногорская Ольга Серафимовна — к.м.н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Круглов Александр Николаевич — к.м.н., заведующий лабораторией микробиологии, ООО «Национальное агентство клинической фармакологии и фармации», Москва

Сидоренко Сергей Владимирович — профессор, д.м.н., заведующий отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Перспективы фармакогенетического тестирования для разработки алгоритмов персонализированного лечения туберкулёза органов дыхания в Астраханском регионе

Б. И. КАНТЕМИРОВА, Х. М. ГАЛИМЗЯНОВ, Н. А. СТЕПАНОВА, А. Х. ЧЕРНЫШЕВА, З. А. АЛИЕВА

Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань

Prospects of Pharmacogenetic Testing for Design of Algorithms for Personalized Treatment of Tuberculosis of Respiratory Organs in the Astrakhan Region

B. I. KANTEMIROVA, KH. M. GALIMZYANOV, N. A. STEPANOVA, A. KH. CHERNYSHEVA, Z. A. ALIEVA

Astrakhan State Medical University, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Astrakhan

Несмотря на наличие большого количества противотуберкулёзных препаратов, туберкулёз в Российской Федерации и за рубежом не становится меньше, а фтизиатры, нередко сталкиваются с проблемой адаптации разработанных схем противотуберкулёзной терапии под каждого конкретного больного. Связано это с часто возникающими побочными эффектами, что нередко служит поводом для отмены специфической химиотерапии. В работе показана роль полиморфизма генов детоксикации как предикторов ответа на лекарственную терапию. Полученные данные позволят обосновать персонализированные подходы к проведению химиотерапии у больных туберкулёзом, повысить её эффективность и безопасность.

Ключевые слова: туберкулёз, гены метаболизма, полиморфизм, побочные эффекты, противотуберкулёзные препараты.

In spite of the availability of many antituberculosis drugs all over the world the morbidity of tuberculosis does not lower. Often the tuberculosis therapy schemes are adapted to every particular patient which is mainly due to the therapy unfavourable effects requiring discontinuation of the drugs used. Polymorphism of the detoxication genes, as predictors of the response to the drug therapy, was shown to be of certain significance. The experimental data would allow to substantiate personalized management of tuberculosis patients and to increase its efficacy and safety.

Key words: tuberculosis, metabolism genes, polymorphism, infavourable effects, antituberculosis drugs.

Введение

По данным ВОЗ, ежегодно в мире заболевают туберкулёзом 9,4 млн человек. Более 1,3 млн больных умирают. Заболеваемость туберкулёзом в Российской Федерации в 2013 году составила 67,7 на 100000 населения, в г. Астрахани — 78,8 [1—6].

Во всём мире неблагоприятное эпидемиологическое обстановка по туберкулёзу определяется в основном двумя факторами: числом не выявленных и числом неизлеченных больных туберкулёзом, которые являются распространителями инфекции. Ежегодно остаются неизлеченными свыше 60% больных [5, 7—11].

Среди причин низкой эффективности лечебных мероприятий, наряду с лекарственной устойчивостью, достигающей 30% у больных с впервые выявленным туберкулёзом легких и 60% у больных с рецидивами и рядом социальных факторов, сле-

дует отметить частое формирование нежелательных побочных эффектов противотуберкулёзных препаратов (ПТП) [9—15]. Непереносимость ПТП заставляет лечащих врачей пересматривать схемы лечения, что нередко влияет на качество этиотропной терапии, удлиняет процесс медикаментозного воздействия, способствует распространению туберкулёза и несёт дополнительные экономические затраты, связанные с поиском новых, более безопасных и эффективных, режимов терапии.

Формирование непереносимости противотуберкулёзных средств напрямую зависит от особенностей метаболизма молекул ПТП, имеющих широкую межиндивидуальную вариабельность и этническую специфичность [16—20].

При рассмотрении вопросов метаболизма противотуберкулёзных препаратов большое значение уделяется изучению полиморфизма генов N-ацетилтрансферазы второго типа (NAT2) и изоферментов цитохрома P 450: CYP2E1 и CYP2C9. Окислением при участии CYP2E1 и CYP2C9 метаболизируется 70—90% изониазида, в результате чего образуется нетоксичная изоникотиновая

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 414000 Астрахань, ул. Бакинская, д. 121. Астраханский ГМУ

кислота [1, 21]. Около 10—30% препарата метаболизируется ацетилированием при участии NAT2. Конечным продуктом ацетилирования является ацетилгидразин, обладающий выраженной гепатотоксичностью. В отечественных и зарубежных литературных источниках обсуждение данного вопроса вызывает оживленную дискуссию. Одни исследователи сходятся во мнении, что пациенты с генотипом медленного ацетилирования более предрасположены к развитию нежелательных побочных эффектов, в частности полинейропатии, по сравнению с быстрыми ацетиляторами [16, 22, 23]. Другие считают, что фенотипически быстрые ацетиляторы составляют основную группу риска развития гепатотоксичности при лечении туберкулеза [15, 24—26]. Авторы объясняют данный механизм накоплением в течение короткого времени высокотоксичного ацетилгидразина.

В литературе имеется множество сведений о роли полиморфных генов системы биотрансформации в формировании предрасположенности к туберкулёзу [2, 15, 27—35]. Нам представилось важным с практической точки зрения, оценить предикторную ценность полиморфных вариантов гена N-ацетилтрансферазы в возникновении определённых видов побочных эффектов, что позволит индивидуализировать схемы специфической терапии, повысить её эффективность и безопасность.

Цель исследования — изучить характер и частоту развития нежелательных побочных эффектов противотуберкулёзных препаратов в зависимости от полиморфизма гена N-ацетилтрансферазы у больных туберкулёзом органов дыхания.

Материал и методы

Изучена медицинская документация впервые выявленных пациентов с туберкулёзом лёгких, получавших лечение в ГБУЗ АО «Областной клинический противотуберкулёзный диспансер», стационар № 1, в 2014–2015 гг. В исследование вошли 100 пациентов: 66 (66%) мужчин, 48 (48%) женщин в возрасте 20—52 лет с впервые выявленным туберкулёзом, у которых на фоне специфического лечения (согласно приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 г. «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в РФ») по I режиму химиотерапии возникли нежелательные побочные реакции на противотуберкулёзные препараты. Суточные дозы всех препаратов рассчитывались согласно концепции химиотерапии [8, 11, 36] и вводились однократно, что создавало высокий пик концентрации препаратов в сыворотке крови. Средняя длительность пребывания пациентов на стационарном лечении составила $5,14 \pm 1,9$ мес.

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета статистических программ для Windows 7. Уровень достоверности статистических гипотез составил 0,05 ($p < 0,05$) по критерию Стьюдента.

Полиморфизм гена NAT2 определяли методом полимеразной цепной реакции, предварительно выделив ДНК из образцов крови. При анализе полученных генотипов гомозиготы S2/S2, S3/S3 и гетерозиготы S2/S3, S1/S2, S3/n, S2/n, S1/S3 интерпретировались нами как генотипы с наследственно обусловленным замедлением скорости ацетилирования. Ге-

нотипы — гомозиготы n/n и S1/S1 расценивались нами как генотипы с быстрой скоростью метаболических реакций.

Результаты и обсуждение

Анализ материалов медицинской документации позволил сделать следующие выводы. Нежелательные побочные реакции (НПР) регистрировались в 67% случаев (67 пациентов). Лекарственно-индуцированное поражение печени (ЛИПП) было выявлено у 44 (65,6%) больных, из них — подтверждённое только повышением уровня трансаминаз в крови — у 38 (86,36%) и у 6 (13,6%) пациентов синдром цитолиза сопровождался клиническими проявлениями (повышение фракций прямого билирубина, желтуха, тошнота, рвота). Полиморфные генотипы NAT2 встречались со следующей частотой: S1/S1 — у 47,74%, n/n — 40,9% и S2/S2 — 11,36% больных.

Со стороны нервной системы НПР токсического характера регистрировались у 20 (29,8%) пациентов в виде головных болей (81,6%), у 14 (18,4%) — в виде расстройства сна. Определялись следующие полиморфные аллели NAT2: S2/S2 (25%), S1/S2 (10%), S3/n (20%), S1/S3 (30%), S3/S3 (35%).

Сердечно-сосудистая система на приём противотуберкулёзных препаратов реагировала следующим образом: повышение артериального давления отмечалось у 21 (31,3%) больного, боли в сердце — у 8 (11,9%), метаболические изменения на ЭКГ — у 7 (9,2%) пациентов. Полиморфные генотипы NAT2 были представлены следующими типами: S2/S2 (12%), S1/S2 (16%), S3/n (14%), S2/n (25%), S1/S3 (14%), S3/S3 (19%).

Со стороны опорно-двигательного аппарата НПР токсического характера в виде артралгий наблюдались у 17 (25,3%) больных, в виде ограничения движений в мелких суставах верхних и нижних конечностей — у 11 (14,5%) человек.

У большинства пациентов отмечалось токсическое поражение одновременно нескольких систем. НПР токсического характера, в частности лекарственно-индуцированное поражение печени (65,6%) превалировало ($r=0,8$; $p < 0,05$).

НПР токсико-аллергического характера зарегистрированы в 27% случаев (27 пациентов). У 17 (62,9%) пациентов это проявлялось зудом и экте-ричностью кожных покровов, тошнотой и рвотой; у 7 (25,9%) больных — зудом, мелкоочечной сыпью, тошнотой, повышением артериального давления, болями в эпигастрии; у 3 (11,2%) больных — сыпью, болями в сердце и суставах, повышением уровня трансаминаз. Анализ полиморфных аллелей гена NAT2 позволил определить преобладание следующих генотипов: S3/n (38%), S2/n (29%), S1/S2 (24%), S2/S3 (9%) (таблица).

Временная отмена ПТП была произведена в 78,9% случаев. Возобновление специфической

Характер нежелательных побочных эффектов противотуберкулёзных препаратов I ряда в зависимости от полиморфных генотипов N-ацетилтрансферазы второго типа (NAT2)

Клинические проявления	Частота возникновения	Полиморфные генотипы NAT2 (частота встречаемости)
Нежелательные побочные эффекты токсического характера — 67 пациентов (67%)		
Лекарственно-индуцированное поражение печени	44 (65,6%)	S1/S1 (47,74 %), n/n (40,9%) и S2/S2 (11,36 %)
Токсическое поражение нервной системы	20 (29,8%)	S2/S2 (25%), S1/S2 (10%), S3/n (20%), S1/S3 (30%), S3/S3 (35%)
Токсическое поражение сердечно-сосудистой системы	21 (31,3%)	S2/S2 (17%), S1/S2 (11%), S3/n (24%), S2/n (15%), S1/S3 (17%), S3/S3 (16%)
Токсическое поражение опорно-двигательного аппарата	17 (25,3%)	S2/S2 (19%), S1/S2 (13%), S3/n (18%), S2/n (27%), S1/S3 (11%), S3/S3 (12%)
Нежелательные побочные эффекты токсико-аллергического характера — 33 пациента (33%)		
Высыпания на коже, зуд и экзема, эритематозность кожных покровов, тошнота, рвота, повышение артериального давления	33 (33%)	S3/n (38%), S2/n (29%), S1/S2 (24%), S2/S3 (9%)

химиотерапии, после купирования нежелательных побочных реакций, осуществлено в 100% случаев. Возобновление НПР было у 30 (26,3%) пациентов, что потребовало замены ПТП. Отмена ПТП, проведение дезинтоксикационной, антигистаминной, гепато-, кардио-, нейропротективной терапии значительно удлиняло сроки пребывания пациентов в стационаре — в среднем на 38 ± 11 койко-дней ($r=0,7$; $p<0,05$).

Выводы

1. У больных туберкулёзом с клиническими проявлениями лекарственно-индуцированного поражения печени среди полиморфных генотипов NAT2 преобладали генотипы, ассоциированные с быстрой скоростью ацетилирования, что, по-видимому, связано с повреждающим действием ацетилгидразина, интенсивно нарастающим в течение короткого времени.

2. У пациентов с токсическим поражением опорно-двигательной и нервной, сердечно-сосудистой систем наиболее часто встречались генотипы, ассоциированные с медленной скоростью

ацетилирования. В данном случае не исключается роль полиморфизма генов других ферментов в метаболизме противотуберкулёзных препаратов, что требует более глубокого изучения данного вопроса.

3. Генотипирование пациентов, получающих противотуберкулёзные препараты, является информативным, диагностически ценным и перспективным методом для разработки стратегии персонализированной фармакотерапии туберкулёзной инфекции с целью предупреждения большого количества нежелательных побочных эффектов и повышения клинической эффективности лечения.

Научное исследование выполнено в рамках реализации гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке молодых ученых докторов наук «Разработка алгоритмов персонализированного лечения и профилактики осложнений туберкулёза органов дыхания в Астраханском регионе» МД-6325.2015.7 (2015-2016 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов А.В. Полиморфизм ферментов метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты и развитие гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: 2011; 24.
2. Макарова С. И., Сафронова О. Г., Вавилин В. А., Батычко О. А., Гавалов С. М. Показатели атопии у детей с бронхиальной астмой возрастают с накоплением нуль-аллелей глутатион-S-трансферазы M1. Бюллетень эксперимен. Биол и мед 2004; 13: 8: 11: 520—522.
3. Михайлова Ю.В., Сон И. М., Скачкова Е. И. Распространение туберкулёза среди детей и подростков в Российской Федерации (анализ данных официальной статистики). Проблемы туберкулёза и болезней лёгких: Научно-практ журн 2009; 1: 5—10.
4. Нечаева О.Б., Скачкова Е.И. Причины формирования множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза в Свердловской области. Здравоохранение Рос Федерации 2003; 3: 33—35.
5. Никишина М.В. Исследование полиморфизма генов ариламинов N-ацетилтрансфераз и ассоциации полиморфных вариантов с раком лёгкого у европеоидов г. Новосибирска: Дисс. канд. биол. наук: Новосибирск, 2007; 125.
6. Филиппов А.В., Борисов С.Е., Сон И.М., Матвеева М.В. Туберкулёз у детей по данным полицейских регистров системы мониторинга туберкулёза: Научные труды / Под ред. В.И. Литвинова. М.: МНПЦБТ. 2010; 177—183.
7. Мордык А.В., Антропова В.В. Влияние неблагоприятных побочных реакций химиотерапии на показатели качества жизни больных инфильтративным туберкулёзом лёгких. Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. 2008; 9: 44—46.
8. Онищенко Г. Г. О заболеваемости туберкулёзом в Российской Федерации в 2012 году Информационное письмо № 01/8843-13-32 Дата принятия — 06.08.2013.
9. Сельцовский П.П., Рыбка Л.И., Кочетова Е.Я., Горбунов А.В. Анализ особенностей эпидемической ситуации по туберкулёзу и системы защиты населения от туберкулёза в г. Москве. Туберкулёз и болезни лёгких. 2011; 6: 10—16.
10. Скакун Н. П., Шманыко В. В. Эффективность антиоксидантов при поражении печени изониазидом. Фармакол токсикол 1986; 49: 4: 86—89.
11. Скачкова Е.И., Нечаева О.Б. О программе государственных гарантий оказания гражданам России бесплатной медицинской помощи в противотуберкулёзных учреждениях. Проблемы туберкулёза 2008; 8: 17.
12. Скакун Н. П., Табачук О. Е. Сравнительная гепатотоксичность изониазида, рифампицина и этамбутола. Проблемы туберкулёза. 1991; 10: 77—79.
13. Скачкова Е.И., Нечаева О.Б. Причины и факторы формирования лекарственной устойчивости при туберкулёзе лёгких. Проблемы туберкулёза 2003; 9: 6—9.

14. Скачкова Е.И. Причины, факторы и группы риска формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза. *Здравоохранение Урала* 2003; 2: 20: 22—25.
15. Ткаченко П.Е., Маевская М.В., Ивашкин В.Т. Полиморфизм генов и лекарственное поражение печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2013; 23: 4: 22—29.
16. Гурова Я.В., Мордык А.В., Пузырева Л.В. Проблема фармакологической непереносимости противотуберкулёзной терапии. *Иммунопатол аллергол инфектол* 2015; 1: 52—58.
17. Кантемирова Б.И., Тимофеева М.В., Григанов В.И., Шилова А.А. Изоферменты цитохрома Р 450. *Астрахан мед журн* 2011; 6: 3: 15—18.
18. Кантемирова Б.И., Тимофеева М.В., Григанов В.И., Шилова А.А. Проблема нежелательных побочных реакций лекарственных средств. *Астрахан мед журн* 2011; 6: 4: 8—12.
19. Кантемирова Б.И., Григанов В.И., Алиева З.Г. Этнический полиморфизм цитохрома Р450 у детей, проживающих в Астраханском регионе. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2013; 1: 9—16.
20. Фисенко В. Противотуберкулёзные средства: принципы действия, побочные эффекты и перспективы создания новых лекарственных препаратов. *Врач* 2006; 12: 30—34.
21. Косарев В.В. Осложнения фармакотерапии. Самара: 1994; 201.
22. Huang Y.S., Chern H.D., Su W.J., Wu J.C., Chang S.C., Chiang C.H., Chang F.Y., Lee S.D. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*. 2003; 37: 4: 924—930.
23. Huang Y.S. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007; 3: 1: 1—8.
24. Сычев Д.А., Игнатев И.В., Гасанов Н.А., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика системы биотрансформации и транспортёров лекарственных средств: дань моде или прикладное направление. *Тихоокеанский мед журн* 2006; 4: 21—26.
25. García-Martín E. Interethnic and intraethnic variability of NAT2 single nucleotide polymorphisms. *Curr Drug Metab* 2008; 9: 6: 487—497.
26. Guengerich F.P. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* 2003; 3: 4: 194—204.
27. Брагина Е.Ю. Сравнительный анализ структуры наследственной компоненты подверженности к бронхиальной астме и туберкулёзу по генам ферментов метаболизма ксенобиотиков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2005; 24.
28. Имангулова М.М. Анализ генов предрасположенности к туберкулёзу лёгких в Республике Башкортостан. Дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2005; 246.
29. Arisawa T., Tahara T., Shibata T., Nagasaka M., Nakamura M. et al. Nrf2 gene promoter polymorphism and gastric carcinogenesis. *Hepatogastroenterology*. 2008 Mar-Apr; 55: 82—83: 750—754.
30. Tamaki Y., Arai T., Sugimura H., Sasaki T., Honda M., Muroi Y., Matsubara Y., Kanno S., Ishikawa M., Hirasawa N., Hiratsuka M. Association between cancer risk and drug-metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in cases of lung cancer in Japan. *Drug Metab Pharmacokin* 2011; 26: 5: 516—522.
31. Kobayashi M., Otani T., Iwasaki M., Natsukawa S., Shaura K., Koizumi Y., Kasuga Y., Sakamoto H., Yoshida T., Tsugane S. Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 and risk of colorectal cancer: a hospital-based case-control study in Japan. *Open Journal of Genetics* 2012; 2: 4: 221—235.
32. Su H.I., Sammel M.D., Velders L., Horn M., Stankiewicz C., Matro J., Gracia C.R., Green J., DeMichele A. Association of cyclophosphamide drug-metabolizing enzyme polymorphisms and chemotherapy-related ovarian failure in breast cancer survivors. *Fertil Steril*. 2010; 94: 2: 645—654.
33. Song D.K., Xing D.L., Zhang L.R., Li Z.X., Liu J., Qiao B.P. Association of NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2A6, and CYP2A13 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in Central China. *Cancer Detect Prev*. 2009; 32: 416—423.
34. Du Toit L.C., Pillay V., Danckwerts M.P. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respiratory Research* 2006; 7: 1: 118—136.
35. Forget E., Menzies D. Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2006; 5: 2: 231—249.
36. Степанова Н.А., Стрельцова Е.Н., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И. Нежелательные побочные эффекты на противотуберкулёзные препараты у впервые выявленных больных туберкулёзом лёгких. *Астраханский мед журн* 2014; 4: 66—71.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кантемирова Бэла Исмаиловна — д. м. н., директор научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии Государственного бюджетного образовательного учреждения «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Галимзянов Халил Мингалиевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней, ректор Государственного бюджетного образовательного учреждения «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Степанова Наталья Александровна — к. м. н., ассистент кафедры фтизиатрии Государственного бюджетного образовательного учреждения «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Чернышева Алия Халиловна — к. б. н., ассистент кафедры фармакологии Государственного бюджетного образовательного учреждения «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Алиева Зайнаб Гаджиевна — аспирант Государственного бюджетного образовательного учреждения «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Биологические функции сукцината (обзор зарубежных экспериментальных исследований)

В. В. ВАЛЕЕВ¹, А. Л. КОВАЛЕНКО², Е. В. ТАЛИКОВА³, В. А. ЗАПЛУТАНОВ⁴, Т. Ю. ДЕЛЬВИГ-КАМЕНСКАЯ⁴

¹ Научно-технологическая фармацевтическая фирма «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

² Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

³ Санкт-Петербургский медико-социальный институт, Санкт-Петербург

⁴ Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Biological Functions of Succinate (a Review of Foreign Experimental Studies)

V. V. VALEEV, A. L. KOVALENKO, E. V. TALIKOVA, V. A. ZAPLUTANOV, T. YU. DELVIG-KAMENSKAYA

Scientific and Technological Pharmaceutical Firm «POLYSAN», St. Petersburg

Institute of Toxicology, Federal Medico-Biological Agency, St. Petersburg

Sankt-Petersburg Medical-Social Institute, St. Petersburg

Sankt-Petersburg State Chemico-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg

Проведён анализ зарубежных научных публикаций, отражающих современные представления о биологической роли сукцината — интермедиата цикла трикарбоновых кислот. Интерес зарубежных исследователей к сукцинату связан с изучением работы митохондрий при различных патофизиологических состояниях, открытием гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1, а также с исследованиями генома человека, благодаря которым были обнаружены G-протеин-зависимые рецепторы, избирательно связывающиеся с сукцинатом. Согласно результатам зарубежных экспериментальных работ, помимо участия в реакциях биологического окисления, сукцинат играет важную роль в регуляции физиологических, метаболических и генетических процессов.

Ключевые слова: сукцинат, митохондриальная дисфункция, гипоксия-индуцибельный фактор, сукцинатные рецепторы, GPR91, Реамберин, Цитофлавин.

The published data on the modern concept of the biological role of succinate, an intermediate of the citric acid cycle are analysed in the review. Special interest to succinate is determined by investigations on the mitochondrial functions at different pathologies, discovery of the hypoxia-inducible factor HIF-1 and studies on the human genome, that resulted in detection of the G-protein coupled receptors, which selectively are bound with succinate. According to the published experimental data, besides participation in oxidative reactions, succinate is considered as a key contributor to physiological, metabolic and genetic processes.

Key words: succinate, mitochondrial disfunction, hypoxia-inducible factor, succinate receptors, GPR91, Reamberine, Citoflavine.

Современные представления о биологической роли сукцината за последнее десятилетие значительно расширились [1—3]. Полученные экспериментальные данные указывают на то, что, помимо участия в реакциях тканевого дыхания, сукцинат (точнее его накопление в клетках и во внеклеточном пространстве) выполняет роль метаболического сигнала, запускающего важные адаптационные механизмы.

В нормальных условиях основное количество сукцината аккумулировано в матриксе митохондрий, где он, окисляясь сукцинатдегидрогеназой (комплекс II), выступает донором дополнительного количества электронов для дыхательной цепи. Основное количество электронов поставляет

NAD⁺, который собирает их от разных субстратов и передает на дыхательную цепь через NADH-дегидрогеназу (комплекс I) [4].

Brealey D. et al [5], а позже Protti A. et al [6] в исследованиях на животных *ex vivo* показали, что при сепсисе в результате окислительного и нитрозативного стресса происходит нарушение функции митохондриального комплекса I. Вследствие этого в клетках наблюдается критическое падение уровня окислительного фосфорилирования, проявляющееся снижением утилизации кислорода даже при его достаточном напряжении в тканях. Развивающийся таким образом дефицит АТФ, по современным представлениям [7], играет фундаментальную роль в развитии полиорганной недостаточности. В таких условиях сукцинат может восстанавливать работу дыхательной цепи, поддерживая поступление электронов через комплекс II, функция которого

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 191119, Россия, Санкт-Петербург, Лиговский пр. 112. ООО «НТФФ «Полисан»

остаётся сохранной. В эксперименте Protti A. et al [6] добавленный сукцинат увеличивал митохондриальное потребление кислорода в скелетных мышцах крыс с перитонитом, что позволило рассматривать применение сукцината как потенциальную стратегию по улучшению функции митохондрий при сепсисе. О протективном эффекте сукцината у животных с сепсисом ранее сообщали и другие исследователи — Malaisse W. J. et al [8], Ferreira F. L. [9].

Снижение активности митохондриального комплекса I и способность экзогенного сукцината в этих условиях улучшать работу дыхательной цепи были продемонстрированы также на моделях ишемии-реперфузии у экспериментальных животных — при временной ишемии сердца (Cairns C. B. et al [10]; Sakamoto M. et al [11]) и почек (Weinberg J. M., [12]). В сценариях «нормо-ишемия-реперфузия» (или «норма-гипоксия-реоксигенация») ключевую роль в повреждении клеток, наряду с дефицитом АТФ, играет окислительный стресс: деактивированный ишемией (гипоксией) комплекс I, не способный поставлять электроны на дыхательную цепь, но способный окисляться кислородом, в условиях реперфузии (реоксигенации) становится местом повышенной генерации активных форм кислорода (АФК) [13]. Возвращение комплекса I в обычное состояние происходит в результате накопления NADH, что требует окисления NAD⁺-зависимых субстратов. Этот процесс может быть ускорен добавлением сукцината, который способствует восстановлению уровня NADH с помощью механизма, называемого «обратным транспортом электронов» [14]. Следовательно, при патофизиологических состояниях, сопровождающихся гипоксией и последующим окислительным стрессом, сукцинат способствует более быстрому восстановлению нормальной работы ферментативной системы митохондрий. Это подтверждают результаты эксперимента Nowak G. et al [15]: в клетках, повреждённых трет-бутилгидропероксидом (оксидант), добавленный сукцинат не только увеличивал синтез АТФ, но и ускорял восстановление активности митохондриального комплекса I и снижал образование малонового диальдегида — маркера перекисного окисления липидов.

Антигипоксическое действие сукцината пролонгируется его влиянием на стабильность и активность гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α , обнаруженного в клетках в 1992 г. [16]. HIF-1 α является кислородчувствительным протеиновым комплексом, который запускает экспрессию целого ряда пептидов, в том числе эритропоэтина (EPO), эндотелиального фактора роста (VEGF), белков-транспортёров глюкозы (GLUT 1, 3), ферментов гликолиза [17]. Длительное время считалось, что единственными сенсо-

рами кислорода у млекопитающих являются хеморецепторные клетки каротидных гломусов и эпидермальных телец в зоне бифуркации *a.carotis*.

Последние исследования указывают на то, что все клетки тела могут ощущать дефицит кислорода и отвечать активацией экспрессии определённых генов, что достигается посредством кислород-зависимой регуляции именно HIF-1 α . В исследованиях Semenza G. L. [18] показано, что у мышей с недостаточностью HIF-1 α способность каротидного тела отвечать на острую или хроническую гипоксию нарушена.

В условиях нормоксии HIF-1 α находится в клетке в неактивном состоянии в результате гидроксирования его пролиновых и аспарагиновых остатков. Его активация происходит при снижении внутриклеточной концентрации кислорода и/или повышении концентрации сукцината, что позволяет рассматривать HIF-1 α как метаболический датчик, реагирующий на гипоксию, а сукцинат — как сигнальную молекулу [1]. Влияние сукцината на активность HIF-1 α осуществляется путём ингибирования протеолиза альфа-субъединицы (HIF- α) пролилгидроксилазой [19].

В крови здоровых людей в условиях нормоксии сукцинат содержится в микромолярных концентрациях — до 20 мкмоль/л [20, 21]. Повышение содержания сукцината в межклеточной жидкости и плазме крови является результатом его накопления в клетках, что наблюдается при гипоксии(ишемии) [22–24], гипергликемии [25] и интенсивной физической деятельности [26]. Увеличение внеклеточных концентраций сукцината, судя по всему, также производит эффект метаболического сигнала. В тканях человека и млекопитающих обнаружены рецепторы, по отношению к которым внеклеточный сукцинат действует как лиганд. Первоначально данные рецепторы считались орфанными и были обозначены как GPR91 (G-protein-coupled receptor 91) [27]. В последующем была определена их высокая избирательность к сукцинату [28] и, поскольку они оказались нечувствительными к остальным компонентам цикла Кребса и другим протестированным фармакологическим агентам, они получили второе название — Succinate receptor 1 (SUCNR1) [2]. GPR91 принадлежат к семейству рецепторов, сопряжённых с G-белками. У человека и экспериментальных животных они обнаружены в почках, печени, клетках крови, жировой ткани, сетчатке, нервной ткани [2, 23, 28].

В лабораторных исследованиях активация человеческих GPR91, приводящая к повышению внутриклеточного Ca²⁺, наблюдалась при концентрации внеклеточного сукцината, значительно превышающей его нормальный уровень в плазме крови (EC₅₀=56±8 мкмоль/л) [28]. Это может свидетельствовать о том, что активность сук-

цинатных рецепторов важна при состояниях, сопровождающихся накоплением внеклеточного сукцината.

Внутривенное введение сукцината у крыс приводило к повышению уровня ренина плазмы крови и умеренному повышению среднего артериального давления (АД) [28]. Такой же эффект у экспериментальных животных вызывала гипергликемия [25]. Эффект отсутствовал у GPR91-дефицитных животных. В связи с этим в настоящее время ряд исследователей (He W. et al [28], Peti-Peterdi J. et al [29]) рассматривают сукцинат как один из возможных метаболических регуляторов ренин-ангиотензиновой системы, функция которого осуществляется через GPR91 почек [28, 29]. Некоторые исследователи (Toma I. [25], Deen P.M. [30]) высказывают гипотезу о том, что повышенный уровень экстрацеллюлярного сукцината может играть патогенетическую роль в развитии гипертонической болезни и метаболического синдрома у человека. Однако эта гипотеза не подтвердилась в исследовании Sadogopan N. et al [21] в котором сравнивались уровни сукцината плазмы крови у больных с гипертонией и сахарным диабетом второго типа и здоровых людей. [21]. Возможно, описанный механизм GPR91-опосредованного выброса ренина является способом регуляции почечного кровотока при ишемии почек, обусловленной артериальной гипотензией.

Hogberg C. et al [31] сообщают о высокой степени экспрессии GPR91 в человеческих тромбоцитах [31]. Стимуляция сукцинатных рецепторов этих клеток в экспериментальных условиях повышала их способность к агрегации за счёт увеличения на их поверхности гликопротеина IIb—IIIa и P-селектина. Данный эффект наблюдался при высоких концентрациях сукцината — 0,3—0,5 ммоль/л. Такие концентрации характерны для внутриклеточного пространства. Вероятно, сукцинат-индуцированная агрегация тромбоцитов служит одним из механизмов локальной активации свёртывающей системы крови при процессах, сопровождающихся массовым повреждением клеток (например, при механической травме).

Экспрессия сукцинатных рецепторов обнаружена в клетках костного мозга человека: CD34+, мегакариocyтах, эритроидных клетках-предшественниках. Nakak Y. et al [32] изучали GPR91-опосредованное влияние сукцината на функцию кроветворения. Введение сукцината у мышей с постхимиотерапевтической миелосупрессией стимулировало восстановление уровня гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов в крови.

Согреа P.R. et al [23] исследовали функцию сукцинатных рецепторов в печени крыс. GPR91 были обнаружены только в звёздчатых клетках. Эти клетки известны тем, что в обычных условиях находятся в «спокойном» состоянии и активизиру-

ются при повреждении печени для запуска фиброгенеза. Обработка звёздчатых клеток раствором сукцината (400 мкмоль/л) усиливала их активацию, вызванную предварительным повреждением печёночной ткани. Исследователи сделали вывод, что сукцинат может играть функцию паракринного сигнала, запускающего приспособительные реакции при повреждении органа.

Известно, что в GPR91-положительных адипоцитах экстрацеллюлярный сукцинат подавляет липолиз [33]. В связи с этим McCreath K. J. et al [34] изучали возможную роль сукцинатных рецепторов в развитии ожирения и получили неоднозначные результаты: на фоне высокожировой диеты мыши, лишённые GPR91 и потому не чувствительные к внешнему сукцинату, поначалу демонстрировали высокий расход энергии и долгое время не набирали вес, однако в последующем у них развивались тяжёлые нарушения углеводного и жирового обмена. Сукцинат, возможно, участвует в центральной регуляции пищевого поведения, являясь промежуточным звеном в глюкозозависимой активации гипоксия-индуцибельного фактора в гипоталамусе. У экспериментальных мышей активность этого транскрипционного фактора в нейронах гипоталамуса влияла на количество потребляемой пищи [35].

Несколько групп исследователей (Gnana-Prakasam J.P. et al [36], Favret S. et al, [38], Li T. et al [37]) изучали функцию сукцинатных рецепторов в сетчатке глаза. GPR91 были обнаружены в ганглионарных клетках, клетках внутреннего ядерного слоя и пигментном эпителии сетчатки, где они индуцировали экспрессию эндотелиального фактора роста (VEGF). Вероятно, сукцинат опосредованно через синтез VEGF принимает участие в регуляции васкулогенеза сетчатки. В настоящее время дефицит GPR91 в сетчатке рассматривается как возможный генетический фактор развития сухой формы макулодистрофии [38], а локальное накопление сукцината и чрезмерная стимуляция GPR91 при хронической гипергликемии — как одна из причин патологического ангиогенеза, лежащего в основе пролиферативной диабетической ретинопатии.

Экспрессия иРНК GPR91 и самого белка определена в нейронах и астроцитах коры головного мозга. Авторы исследования (Hamel D. et al [24]) полагают, что сукцинат как лиганд GPR91 играет ведущую роль в неоваскуляризации ткани мозга при его ишемическом повреждении. В зоне пенумбры у мышей в течение первых 90 минут после развития инфаркта мозга отмечалось трёхкратное повышение уровня сукцината с последующим его снижением в течение часа до базального уровня. В течение первых суток в исследуемой области коры мозга отмечалось снижение капиллярной плотности, которая в последующем повышалась у мышей

«wild type» и оставалась на низком уровне у GPR91-отрицательных особей. Введение сукцината внутрь желудочков мозга индуцировало у диких мышей экспрессию основных проангиогенных факторов (VEGF, проангиоген-1, проангиоген-2, интерлейкин-1 β , интерлейкин-6) и не оказывало значимого эффекта у GPR91-отрицательных мышей. Авторы эксперимента полагают, что целенаправленное воздействие на сукцинатные рецепторы головного мозга при его ишемическом повреждении может стимулировать неоваскуляризацию нервной ткани и тем самым способствовать уменьшению зоны инфаркта.

Описанные эффекты сукцината явились основанием для разработки его терапевтического применения при целом ряде заболеваний. К сожалению, почти все иностранные публикации о сукцинате опираются только на экспериментальные данные и не подкреплены клиническим опытом. В отечественной науке также существует целый ряд экспериментальных исследований, посвящённых метаболической и фармакологической активности сукцината. Более того, в нашей стране сукцинат в составе разных препаратов уже достаточно долго и с успехом применяется в качестве субстратного антигипоксанта и органопротектора при различных патофизиологических состояниях. Важно заметить, что накопленные результаты клинического применения сукцината согласуются с наиболее важными эксперимен-

тальными данными зарубежных исследований. Так, было показано, что внутривенное введение сукцинатсодержащего препарата цитофлавина у пациентов с разлитым перитонитом в качестве антигипоксанта в послеоперационном периоде улучшает потребление кислорода тканями и приводит к снижению уровня лактата крови [39]. У пациентов, переживших острую гипоксию вследствие отравления нейротропными ядами, использование сукцинатсодержащих препаратов (цитофлавин, реамберин) на фоне ИВЛ в первые-третьи сутки интенсивной терапии не только способствует более быстрому (по сравнению с контрольной группой) восстановлению аэробного типа окисления в тканях, но и уменьшает выраженность окислительного стресса [40]. Согласно результатам многоцентрового клинического исследования [41], применение сукцинатсодержащего препарата цитофлавина в качестве нейропротективной терапии у пациентов с ишемическим инсультом в течение первых 10–20 дней заболевания способствует уменьшению очага поражения головного мозга, что сопровождается улучшением неврологического и функционального статуса.

Универсальные механизмы, лежащие в основе приспособительных реакций, в которых участвует сукцинат, делают его клиническое применение оправданным и эффективным при многих острых расстройствах жизнедеятельности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mills E., O'Neill L.A. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol* 2014; 24; 5: 313–320.
2. Ariza A.C., Deen P.M., Robben J.H. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 22.
3. Chen T.T., Maevsky E.I., Uchite M.L. Maintenance of homeostasis in the aging hypothalamus: the central and peripheral roles of succinate. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6: 7.
4. Биохимия: учебник / Под ред. Е.С. Северина. 5-е изд. М, ГЭОТАР-Медиа 2011. / Biohimija: uchebnik / Pod red. E.S. Severina. 5-e izd. M, GJeOTAR-Media 2011. [in Russian]
5. Brealey D., Brand M., Hargreaves I. et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360: 9328: 219–223.
6. Protti A., Carré J., Frost M. et al. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Crit Care Med* 2007; 35: 9: 2150–2155.
7. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 2014; 5: 1: 66–72.
8. Malaisse W.J., Nadi A.B., Ladrière L. et al. Protective effects of succinic acid dimethyl ester infusion in experimental endotoxemia. *Nutrition* 1997; 13: 330–341.
9. Ferreira F.L., Ladrière L., Vincent J.L. et al. Prolongation of survival time by infusion of succinic acid dimethyl ester in a caecal ligation and perforation model of sepsis. *Horm Metab Res* 2000; 32: 335–336.
10. Cairns C.B., Ferroggiaro A.A., Walther J.M. et al. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 1997; 96: 9: Suppl: 260–265.
11. Sakamoto M., Takeshige K., Yasui H., Tokunaga K. Cardioprotective effect of succinate against ischemia/reperfusion injury. *Surg Today* 1998; 28: 5: 522–528.
12. Weinberg J.M., Venkatachalam M.A., Roeser N.F., Saikumar P. et al. Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 5: F927–943.
13. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. *Успех биол хим* 2013; 53: 245–296. / Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Generacija aktivnyh form kisloroda mitohondrijami. *Uspeh biol him* 2013; 53: 245–296. [in Russian]
14. Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Митохондриальный комплекс I. *Успех биол хим* 2003; 43: 19–58. / Grivennikova V. G., Vinogradov A. D. Mitohondrial'nyj kompleks I. *Uspeh biol him* 2003; 43: 19–58. [in Russian]
15. Nowak G., Clifton G.L., Bakajsova D. Succinate ameliorates energy deficits and prevents dysfunction of complex I in injured renal proximal tubular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 3: 1155–1162.
16. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447–5454.
17. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1469–1480.
18. Semenza G. L. O₂ regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF1. *J Appl Physiol* 2004; 96: 3: 1173–1177.
19. Koivunen P., Hirsilä M., Remes A.M. et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem* 2007; 282: 7: 4524–4532.
20. Kushnir M.M., Komaromy-Hiller G., Shushan B. et al. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin Chem* 2001; 47: 11: 1993–2002.
21. Sadagopan N., Li W., Roberds S.L. et al. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens* 2007; 20: 1209–1215.
22. Reinke S.N., Walsh B.H., Boylan G.B. 1H NMR derived metabolomic profile of neonatal asphyxia in umbilical cord serum: implications for hypoxic ischemic encephalopathy. *J Proteome Res* 2013; 12: 9: 4230–4239.

23. Correa P.R., Kruglov E.A., Thompson M. *et al.* Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatol* 2007; 47: 2: 262–269.
24. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F. *et al.* G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 Feb; 34: 2: 285–293.
25. Toma I., Kang J.J., Sipos A. *et al.* Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest* 2008; 118: 2526–2534.
26. Hochachka P. W., Dressendorfer R. H. Succinate accumulation in man during exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 1976; 35: 235–242.
27. Wittenberger T., Schaller H.C., Hellebrand S. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol* 2001; 307: 799–813.
28. He W., Miao F.J., Lin D.C. *et al.* Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 2004; 429: 6988: 188–193.
29. Peti-Peterdi J., Gevorgyan H., Lam L., Riquier-Brison A. Metabolic control of renin secretion. *Pflugers Arch.* 2013; 465: 1: 53–58.
30. Deen P.M., Robben J.H. Succinate receptors in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 8: 1416–1422.
31. Höglberg C., Gidlöf O., Tan C. *et al.* Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase- β signaling. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 2: 361–372.
32. Hakak Y., Lehmann-Bruinsma K., Phillips S. *et al.* The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 5: 837–843.
33. Regard J.B., Sato I.T., Coughlin S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* 2008; 31: 135: 3: 561–571.
34. McCreath K.J., Espada S., Gálvez B.G., Benito M., de Molina A., Sepúlveda P., Cervera A.M. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes*. 2015; 64: 4: 1154–1167.
35. Zhang H., Zhang G., Gonzalez F.J. *et al.* Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol* 2011; 9: 7: e1001112.
36. Gnana-Prakasam J.P., Ananth S., Prasad P.D. *et al.* Expression and iron-dependent regulation of succinate receptor GPR91 in retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 6: 3751–3758.
37. Li T., Hu J., Du S. *et al.* ERK1/2/COX-2/PGE2 signaling pathway mediates GPR91-dependent VEGF release in streptozotocin-induced diabetes. *Mol Vis* 2014; 31: 20: 1109–1121.
38. Favret S., Binet F., Lapalme E. *et al.* Deficiency in the metabolite receptor SUCNR1 (GPR91) leads to outer retinal lesions. *Aging (Albany NY)* 2013; 5: 6: 427–444.
39. Багненко С.Ф., Батоцыренов Б.В., Горбачев Н.Б. и др. Применение цитофлавина в коррекции метаболических нарушений у больных с разлитым перитонитом в послеоперационном периоде. *Вест интенсив тер* 2006; 3: 29–32. / Bagnenko S.F., Batocyrenov B.V., Gorbachev N.B. i dr. Primenenie citoflavina v korrekcii metabolicheskikh narushenij u bol'nyh s razlitym peritonitom v posleoperacionnom periode. *Vest intensiv ter* 2006; 3: 29–32. [in Russian]
40. Ливанов Г.А., Мороз В.В., Батоцыренов Б.В., Лодягин А.Н. Пути фармакологической коррекции последствий гипоксии при критических состояниях у больных с острыми отравлениями. *Анестезиол реаниматол* 2003; 2: 51–54. / Livanov G.A., Moroz V.V., Batocyrenov B.V., Lodjagin A.N. Puti farmakologicheskoy korrekcii posledstvij gipoksii pri kriticheskikh sostojanijah u bol'nyh s ostrymi otravlenijami. *Anesteziol reanimatol* 2003; 2: 51–54. [in Russian]
41. Румянцев С.А., Силина Е.В., Чичановская Л.В. и др. Эффективность антиоксидантной энергокоррекции при инфаркте головного мозга (результаты многоцентрового рандомизированного исследования). *Журн неврол психиатр им. С.С. Корсакова* 2014; 10: 49–55. / Rumjanceva S.A., Silina E.V., Chichanovskaja L.V. i dr. Jefferktivnost' antioksidantnoj jenergokorrekcii pri infarkte golovnogogo mozga (rezul'taty mnogocentrovogo randomizirovannogo issledovanija). *Zhurn nevrologii i psixiatrii im. S.S. Korsakova* 2014; 10: 49–55. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Валеев Вадим Владиславович — менеджер по научной и клинической работе отдела координации медико-биологических исследований ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

Коваленко Алексей Леонидович — д. б. н., доцент, дважды лауреат премии правительства РФ в области науки и техники, ФМБА ФГБУН «Институт токсикологии Федерально-го медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Таликова Екатерина Владимировна — к. м. н., доцент кафедры морфологии, патологии и судебной медицины ЧОУ ВПО «Санкт-Петербургский Медико-Социальный институт», Санкт-Петербург

Заплутанов Василий Андреевич — ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург

Обоснование использования экспрессионных маркёров для персонализации химиотерапии рака лёгкого

М. М. ЦЫГАНОВ^{1,2}, Е. О. РОДИОНОВ¹, С. В. МИЛЛЕР¹, Н. В. ЛИТВЯКОВ^{1,2}

¹ Томский НИИ онкологии, Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

Substantiation of Expressive Markers Use to Personalize Lung Cancer Chemotherapy

M. M. TSYGANOV, E. O. RODIONOV, S. V. MILLER, N. V. LITVYAKOV

Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk

Tomsk State University, Tomsk

Результаты хирургического лечения рака лёгкого в II—III стадии остаются неудовлетворительными, а используемая химиотерапия не даёт существенного прироста показателя выживаемости больных. Основным препятствием является недостаточно эффективный подбор химиопрепаратов и тактики лечения конкретного больного, основанный только на использовании стандартных клинических параметров. Существенная роль в формировании устойчивости опухоли лёгкого к назначаемым химиопрепаратам отводится генам монорезистентности, которые определяют резистентность/чувствительность опухолевых клеток к конкретным химиопрепаратам. В представленном обзоре рассмотрены механизмы транспорта, активации и мишени химиопрепаратов, определяются основные маркёры для прогнозирования их эффективности, а также возможность их применения в клинической практике. Для рака лёгкого охарактеризованы такие гены монорезистентности, как *ABCC5*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3* и *TYMS*. Приведены результаты клинических исследований, доказывающие эффективность их использования в качестве предиктивных маркёров для назначения отдельных химиопрепаратов. Манифестируется проспективное исследование авторов статьи с персонализированным назначением адъювантной химиотерапии больным раком лёгкого.

Ключевые слова: рак лёгкого, химиотерапия, гены монорезистентности.

Surgery results of II—III stage lung cancer remain unsatisfactory and the chemotherapy does not improve the survival. The main obstacle is the use of the standard clinical parameters for the treatment strategy and not sufficiently effective selection of regimens for the chemotherapy. Monoresistance genes defining the tumor cells sensitivity to the chemotherapeutic drugs play a significant role in development of the lung tumor resistance. The review examines the mechanisms of transport, activation and targets of the chemotherapeutic drugs, identifies the key markers for predicting their effectiveness and possible use in the clinical practice. Monoresistance genes, such as *ABCC5*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3* and *TYMS* are characteristic of lung cancer. Clinical trials demonstrating the efficiency of their use as predictive markers for the lung cancer chemotherapy are described. A prospective study with a personalized adjuvant chemotherapy for lung cancer patients will be performed.

Key words: lung cancer, chemotherapy, monoresistance genes.

Введение

Показатели 5-летней выживаемости у больных немелкоклеточным раком лёгкого (НМРЛ) прогрессивно снижаются в зависимости от местной распространённости онкологического процесса и состояния лимфатического аппарата. Так, у больных в I стадии заболевания показатели выживаемости находятся в диапазоне между 50 и 70%, во II стадии — от 30 до 50% и от 10 до 30% у пациентов в IIIA стадии заболевания [1]. К моменту установления диагноза более 75% больных раком лёгкого имеют местнораспространённый или метастатический процесс, поэтому важней-

шей задачей повышения эффективности лечения остается разработка новых способов комбинированного лечения, включающих системную химиотерапию.

Системная противоопухолевая терапия призвана дополнить хирургическое лечение опухоли лёгкого. В составе комбинированного лечения химиотерапия при операбельном НМРЛ может применяться как до операции, так и после неё. Основная задача предоперационной (неадъювантной) химиотерапии — НАХТ) состоит в повреждении опухолевых клеток, снижении степени их злокачественности, санации лимфатических путей корня лёгкого и средостения для предупреждения лимфо- и гематогенного метастазирования и, следовательно, рецидива болезни состоит в повреждении опухолевых клеток, снижении степени их

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5. Томский НИИ онкологии

злокачественности, уменьшения объёма опухоли для перевода её в операбельное состояние [2].

Эффективность НАХТ определяется уменьшением размеров первичной опухоли, повышением операбельности и резектабельности опухоли; ликвидацией или профилактикой микрометастазов [3].

Целью адъювантной химиотерапии является эрадикация или длительное подавление микрометастазов рака лёгкого после удаления первичной опухоли. Послеоперационная химиотерапия может быть применима уже пациентам с IV стадией НМРЛ (размер опухоли более 4 см). В общей сложности 23 рандомизированных исследования, проведённых с 1992 по 2005 гг., и пять дополнительных метаанализов показали, что адъювантная химиотерапия улучшает выживаемость у пациентов в II—III стадии НМРЛ [2].

Тем не менее эффективность лечения больных НМРЛ по-прежнему не велика. Пятилетняя выживаемость составляет около 35—40% (по сравнению с 30% при только хирургическом лечении) [4]. В связи в этом остро стоит вопрос поиска возможностей повышения эффективности лекарственного лечения НМРЛ, и одним из основных путей повышения эффективности химиотерапии является персонализация подбора химиопрепаратов.

Персонализация химиотерапии

Применение стандартных и разработка новых схем химиотерапии в значительной мере исчерпали свои возможности в плане повышения эффективности лечения. Основным препятствием на этом пути является недостаточно эффективный выбор химиопрепаратов и тактики лечения конкретного больного, основанный на использовании стандартных клинических, прогностических и предсказательных критериев. Наличие/отсутствие в опухолевых клетках определённых маркёров приводит к тому, что опухоли, которые классифицируются как одинаковые по стандартным параметрам и имеющие одинаковую стадию по классификации TNM, тем не менее различаются по агрессивности течения заболевания и чувствительности к различным противоопухолевым средствам, что затрудняет выбор оптимального лечения для конкретного больного.

Определение индивидуальной чувствительности опухоли к отдельным химиопрепаратам даёт возможность планировать лечение конкретного больного [5]. Такой подход является в настоящее время основным мировым трендом развития лекарственного лечения злокачественных новообразований, и первые его результаты позволили значительно увеличить эффективность конвенциональной химиотерапии.

Список основных конвенциональных химиопрепаратов, которые в настоящее время чаще все-

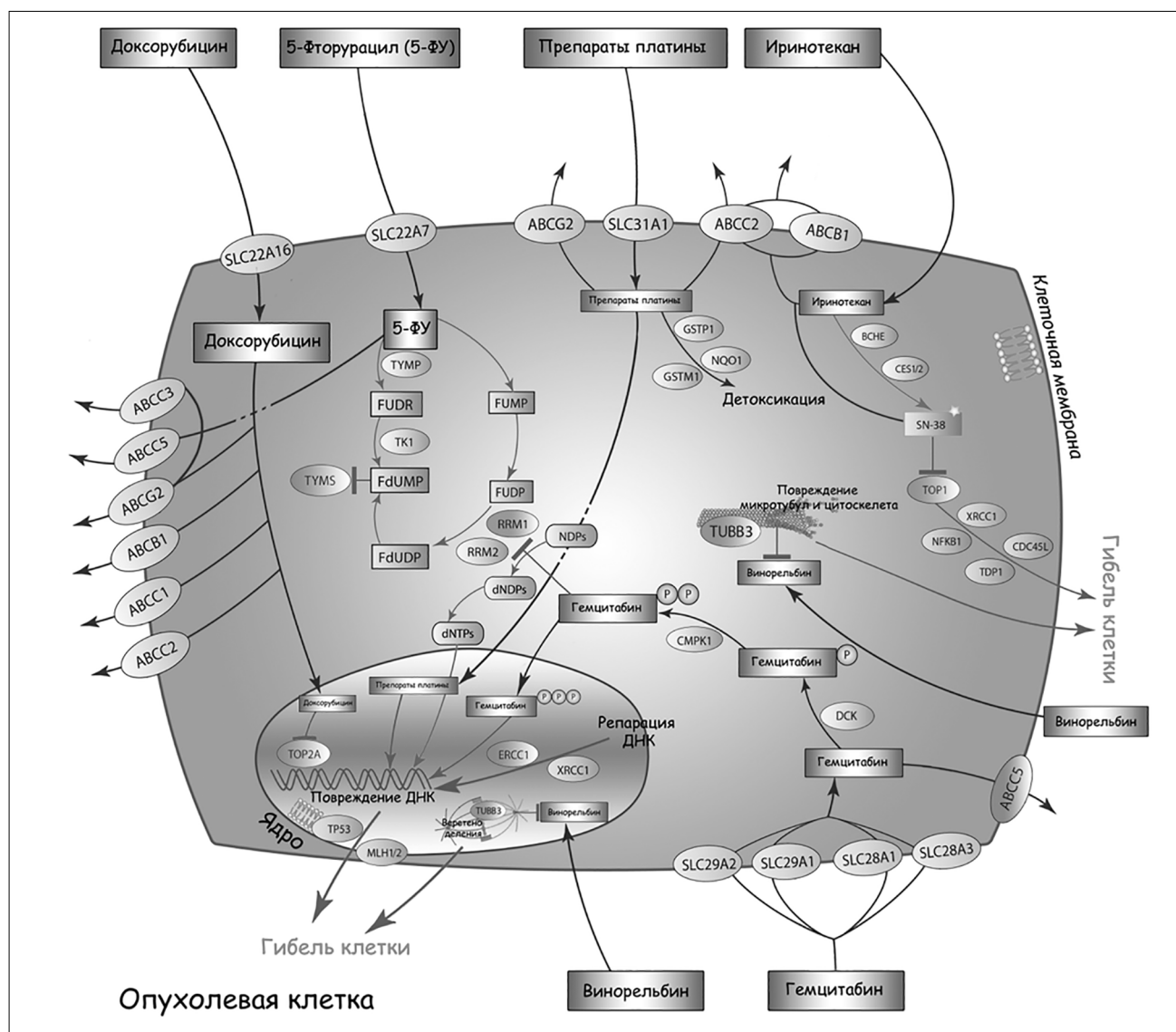
го используются для лечения НМРЛ, достаточно ограничен и включает в себя: препараты платины, винорельбин, гемцитабин, иринотекан, доксорубин, фторурацил. Обычно используется комбинация препаратов платины с другим цитостатиком из представленного списка. Существенная роль в формировании устойчивости опухоли лёгкого к данным химиопрепаратам принадлежит генам монорезистентности, которые определяют резистентность/чувствительность опухолевых клеток к отдельным химиопрепаратам, и связана с фармакокинетикой этих препаратов.

В настоящее время при раке лёгкого рассматриваются такие гены, как: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS* [6, 7], в связи с чем экспрессию данных биомаркёров в опухолевой ткани лёгкого важно учитывать для персонализации лекарственной терапии НМРЛ.

На объединённом рисунке представлена фармакокинетика рассматриваемых противоопухолевых препаратов, с участием обозначенных выше маркёров. Рисунок сделан авторами статьи по материалам сайта по фармакогеномике (<https://www.pharmgkb.org/index.jsp>).

Ниже рассмотрены механизмы транспорта, активации и мишени каждого из химиопрепаратов в отдельности, а также определяются основные маркёры для прогнозирования их эффективности, а также приводятся результаты клинических исследований по этим маркёрам, которые показывают их эффективность.

Препараты платины. Препараты платины являются одними из наиболее частых лекарственных средств, применяемых при лечении рака лёгкого. В опухолевую клетку препарат проникает посредством трансмембранного белка SLC31A1, участвующего в регуляции поступления различных веществ в клетку, в частности ионов меди и цисплатина [8]. Предиктивными маркёрами препаратов платины являются гены репарации ДНК, активность которых защищает ДНК опухоли от повреждающего действия препаратов платины. Например, повышенная экспрессия генов эксцизионной репарации *XRCC1* и *ERCC2* позволяет опухоли нейтрализовать воздействие препаратов платины и алкилирующих агентов [9]. Однонуклеотидные полиморфизмы в таких генах, как *ERCC1*, *XPB1* и *XRCC1*, ассоциированы с результатом лечения больных раком лёгкого препаратами платины, в частности цисплатином и карбоплатином [10]. Продукты генов *XPA*, *ERCC1* и *ERCC4* формируют комплексное соединение, которое участвует в распознавании повреждённых участков ДНК и включается в процесс их репарации. В недавних исследованиях была показана корреляционная зависимость между экспрессией *ERCC1* и реакцией на химиотерапию препаратами платины при раке желудка, печени, раке прямой и



Фармакокинетика препаратов платины, винорельбина, гемцитабина, иринотекана, доксорубина и фторурацила (по материалам сайта по фармакогеномике (<https://www.pharmgkb.org/index.jsp>)).
Комментарии в тексте.

ободочной кишки, раке лёгкого [11–13]. Китайскими авторами показано, что при НМРЛ ингибирование экспрессии *ERCC1* связано с благоприятным прогнозом лечения [14]. Подобное исследование было проведено и итальянскими коллегами, которые продемонстрировали, что у пациентов с низкой или нулевой экспрессией *ERCC1* в опухоли наблюдалась высокая эффективность лечения НМРЛ цисплатином и высокая выживаемость [15]. Однако несколько других исследований не подтвердили достоверной ассоциации между уровнем экспрессии *ERCC1* и клиническим результатом лечения опухоли лёгкого [16].

В клинических исследованиях было продемонстрировано, что ген *ERCC1* может являться хорошим прогностическим маркёром ответа опухоли лёгкого на лечение карбоплатином [17].

Крупное исследование влияния экспрессии *ERCC1* на эффективность лечения НМРЛ по платиносодержащим схемам адъювантной химиотерапии было проведено американскими исследователями [18]. Уровень экспрессии данного гена был оценен в 761 образце опухоли, при этом была выявлено 335 (44%) образцов с высоким уровнем экспрессии и 426 (56%) — с низким или нулевым. Эффективность проводимой химиотерапии статистически значимо ($p=0,009$) коррелировала с уровнем экспрессии *ERCC1*. У пациентов с низкой или нулевой экспрессией наблюдался хороший ответ на лечение. Кроме этого, авторы оценили общую выживаемость исследуемых больных и оказалось, что у пациентов с *ERCC1*-негативными опухолями общая выживаемость достоверно выше, чем в группе без проведения

адъювантной химиотерапии (OR 0,65; 95% [CI], 0,50—0,86; $p=0,002$). При этом в группе ERCC1-положительных пациентов выживаемость ниже (OR 1,14; 95% [CI], 0,84—1,55; $p=0,40$), [18].

Винорельбин. Для винорельбина, ещё одного противоопухолевого препарата растительного происхождения, важна экспрессия в опухоли $\beta 3$ -тубулина (*TUB $\beta 3$*) основного строительного материала микротрубочек, которые разрушает винорельбин. Высокая экспрессия *TUB $\beta 3$* связана с хорошим ответом на адъювантную химиотерапию по схеме цисплатин+винорельбин [19]. *TUB $\beta 3$* участвует в формировании микротрубочек, которые в свою очередь участвуют в сегрегации хромосом во время клеточного деления, поддержании формы клетки и внутриклеточном обмене макромолекул и органелл [20]. Винорельбин способствуют затвердеванию полимеризуемых микротрубочек, приводя к сдвигу равновесия между димерами тубулина и микротрубочками в сторону микротрубочек. В результате они стабилизируются и не подвергаются деполимеризации [21]. Это блокирует их функцию, вызывая нарушения в структуре веретена деления, что приводит к гибели клетки.

В клиническом исследовании 2012 года была показана важная роль экспрессии *TUB $\beta 3$* в прогнозе и лечении больных с ранним немелкоклеточным раком лёгкого [22]. Авторами было изучено 412 образцов опухолей от больных с диагнозом раннего НМРЛ, которые получали неоадъювантную химиотерапию таксанами или гемцитабином. Было показано, что в группе пациентов ($n=285$) с высокой экспрессией белка *TUB $\beta 3$* общая выживаемость больных достоверно ниже (71,7 мес) по сравнению с группой ($n=127$), в которой наблюдался низкий уровень экспрессии данного гена (84 месяца). Хотя в других исследованиях ассоциации экспрессии *TUB $\beta 3$* с эффективностью химиотерапии паклитакселом и винорельбином показано не было [21]. Но при этом авторы установили, что в группах с низким уровнем экспрессии изучаемого гена безрецидивная и общая выживаемость больных достоверно выше, в сравнении с группами с повышенным уровнем экспрессии ($p=0,008$ и $p=0,001$ соответственно). Совсем недавно был выпущен большой обзор доклинических и клинических исследований прогностической и предиктивной значимости экспрессии *TUB $\beta 3$* в опухоли лёгкого больных, получавших винорельбин и таксаны. Сделано заключение о прогностической и предиктивной ценности данного маркера при раке лёгкого, хотя для подтверждения этого требуется проспективное исследование [23].

Гемцитабин. Ещё одним важным химиопрепаратом, применяемом при лечении опухоли лёгкого, является антиметаболит цитидина-гемци-

табин (гемзар). Гемцитабин проникает в опухолевую клетку за счёт работы белков-переносчиков продуктов генов *SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC28A1* и *SLC28A3* (см. рисунок). Данные трансмембранные белки осуществляют транспорт пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов, а также их производных [24]. Следует отметить, что важным препятствием эффективности гемзара является резистентность опухолевой клетки к данному препарату за счёт экспрессии ABC-транспортёров подсемейства С. Была установлена обратная зависимость между экспрессией *ABCC5* и чувствительностью клетки к гемзару [25], при этом экспрессия *ABCC5* и *ABCC1* увеличивается в нормальной ткани и в ткани опухоли лёгкого после лечения препаратами платины. Для активации гемцитабина происходит его последовательное фосфорилирование, за счёт действия ферментов деоксицитидин киназы (DCK) и цитидин-монофосфат киназы 1 (CMPK1). Активной формой препарата является гемцитабин-дифосфат, который через ингибирование *RRM1* (фермента катализирующего формирование dNTP из рибонуклеотидов (rNTP)) приводит к дефициту дезоксирибонуклеотидов (dNTP) — основного материала для репарации разрывов в ДНК [26]. Следующая активная форма — гемцитабин трифосфат непосредственно интегрируется в ДНК, блокирует репарацию, вызывает торможение синтеза ДНК и в конечном итоге приводит к запуску апоптоза [27].

В последних исследованиях было показано, что высокое содержание белка Rrm1 в опухоли лёгкого и желудка является важным показателем неэффективности химиотерапевтического лечения гемзаром [6, 28]. В третьей стадии клинических испытаний было продемонстрировано, что гены *ERCC1* и *RRM1* могут являться хорошими прогностическими маркерами ответа опухоли лёгкого на лечение карбоплатином и гемцитабином соответственно [17]. В исследование было включено 275 пациентов. Для назначения лечения экспрессию генов оценивали в биопсии, и в зависимости от уровня все больные были разделены на определённые группы: при низком уровне *RRM1* и *ERCC1*, группа со схемой химиотерапии гемцитабин/карбоплатин; если уровень *RRM1* и *ERCC1* был высоким, назначалась схема доцетаксел/винорельбин. Авторами была оценена полугодовая безрецидивная выживаемость и годовичная выживаемость представленных групп по сравнению с контролем. По годовичной выживаемости различия были получены на уровне тенденции, безрецидивная выживаемость была статистически значимо выше в группе пациентов с сочетанным низким уровнем *RRM1* и *ERCC1* пролеченных по схеме гемцитабин/карбоплатин по сравнению с контрольной группой, пролечен-

ной по той же схеме (Log-rank, $p=0,018$). Авторами было высказано предположение о том, что предварительная оценка экспрессии генов-маркёров *RRM1* и *ERCC1* может являться хорошим фактором выбора оптимальной схемы химиотерапии, а также влиять на отдалённые результаты лечения [17].

5-Фторурацил. 5-Фторурацил, также как и гемцитабин является антиметаболитом, применяемым при лечении опухолей молочной железы, колоректального рака, опухолей дыхательных путей и др. Поступление препарата в опухолевую клетку осуществляется благодаря работе продукта гена *SLC29A1/7* [29] (см. рисунок). Было показано, что продукт данного гена является трансмембранным белком-транспортёром и имеет высокое сродство к нуклеотидам: тимидину, аденозину, цитидину и гуанозину [30], беспрепятственно проводит эти вещества и их производные в клетку (в том числе и опухолевую). После поступления в клетку 5-фторурацил частично выводится за счёт действия энергозависимых белков ABC-транспортёров *ABCC3*, *ABCC5* и *ABCG2* [31]. Оставшаяся часть препарата за счёт тимидилат фосфорилазы (*TYMP*) преобразуется в флюоро-деокси-уридин (FUDR). Далее через действие тимидин киназы 1 (TK1) FUDR превращается в флюоро-деокси-уридин монофосфат (FdUMP), основной мишенью которого является фермент тимидилатсинтаза (TYMS), катализирующий реакцию образования *de novo* тимидилата, предшественника тимидинтрифосфата — нуклеотида, необходимого для синтеза ДНК (см. рисунок). Ингибирование TYMS ведёт к снижению включения в ДНК тимидина и тем самым к нарушению синтеза ДНК. Кроме этого, включение 5-фторурацила в РНК вместо урацила приводит к нарушению структуры и функции РНК, блокирования трансляции, в результате чего опухолевая клетка погибает [32]. Кроме этого, FdUMP может быть получен за счёт косвенного цикла преобразования 5-фторурацила: фермент рибонуклеотид редуктаза (*RRM1/RRM2*) способствует получению модифицированных дезоксирибонуклеотидов флюоро-деокси-уридин дифосфата (FdUDP) и FdUMP (см. рисунок).

Была показана важная роль гена *RRM1* в ответе опухоли на действие 5-фторурацила и гемцитабина. Установлено, что высокая экспрессия *RRM1* ($p=0,048$) и *TYMS* ($p=0,035$) статистически значимо коррелирует с чувствительностью к гемцитабину и 5-фторурацилу соответственно [33]. Другие авторы обнаружили, что экспрессия *RRM1* играет важную роль в комбинированной химиотерапии с применением 5-фторурацила и препаратов платины, и, кроме того, может участвовать в регуляции непосредственного противоопухолевого эффекта 5-фторурацила [34].

Иринотекан. Иринотекан (кампто) является противоопухолевым препаратом растительного происхождения и применяется для лечения колоректального рака [35, 36], немелкоклеточного рака лёгкого [37], рака желудка [38], опухолей молочной железы [39], кроме того, иринотекан применяется при лечении опухолей головного мозга [40] и при других локализациях [41]. Механизм активации данного препарата заключается в его преобразовании в активную форму SN-38, за счёт работы бутирилхолинэстеразы (BCHE) и карбоксилэстеразы 1 и 2 (CES1/2), основной функцией которых является гидролизация различных ксенобиотиков и эндогенных субстратов [42]. SN-38 обладает высоким цитотоксическим действием и вызывает нерепарируемые однонитевые разрывы ДНК (см. рисунок). Мишенью действия препарата является топоизомераза 1 (*TOP1*) — фермент, участвующий в изменении топологии ДНК и разрезающий нить ДНК для предотвращения её суперспирализации и натяжения при репликации и транскрипции. SN-38 связывается с комплексом топоизомеразы 1 — ДНК, стабилизирует его и препятствует его диссоциации (см. рисунок). Появление такого комплекса ингибирует работу ферментов, обеспечивающих репарацию ДНК — *XRCC1*, *nFkB1*, *TDP1*, *CDC45L* [43]. Образуются нерепарируемые однонитевые разрывы, которые определяют гибель опухолевой клетки [44]. Резистентность к иринотекану и его производному SN-38 обеспечивается генами *ABCC2*, *ABCB1* и *ABCG2*, способными элиминировать эти вещества из опухолевой клетки против градиента концентрации [43].

Клинических данных о влиянии уровня экспрессии *TOP1* на эффективность химиотерапии достаточно мало. Некоторые данные были косвенно подтверждены в работе японских авторов [45]. Ими было установлено, что появление мутаций в гене *TOP1* в процессе химиотерапии иринотеканом вызывает развитие резистентности и неэффективности применяемого лечения. На клеточных линиях аденокарциномы лёгких было продемонстрировано, что чувствительность к иринотекану пропорциональна уровню *TOP1* [46]. Амплификация локуса гена *TOP1* обуславливает хороший ответ на иринотекан при колоректальном раке, раке молочной железы и раке поджелудочной железы [47–49].

Доксорубицин. Доксорубицин воздействует на другой фермент группы топоизомераз — топоизомеразу 2α (*TOP2α*) [50]. Данный фермент работает в ядре клетки и имеет схожие функции с *TOP1*. Он изменяет топологию ДНК (разрезает нить ДНК при раскручивании во время транскрипции), кроме того, фермент катализирует раскрутку суперспиралей ДНК, разрыв и сшивку молекул нуклеиновой кислоты [51]. Основной

мишенью доксорубицина является ядерная ДНК. При прямом действии доксорубицина происходит образование одиночных и двойных разрывов ДНК [52]. Воздействие на *TOP2α* вызывает его ингибирование и невозможность клетки репарировать повреждённые участки ядерной ДНК, в результате чего происходит запуск апоптоза и некроза опухолевой клетки [53]. Подобно другим препаратам выведение доксорубицина из клетки обеспечивается повышенной экспрессией генов ABC-транспортёров — *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCB1* и *ABCG2* (см. рисунок) [22, 54, 55].

Клинических данных о влиянии экспрессии *TOP2α* на результаты лечения немелкоклеточного рака лёгкого мало. Такие исследования сосредоточены в основном на тех локализациях, где данный препарат используется чаще. Исследования на клеточной линии рака молочной железы MCF-7 показали, что у резистентной к доксорубину линии клеток экспрессия *TOP2α* в 200 раз ниже, чем у чувствительной линии клеток MCF-7 [56]. При раке молочной железы на 55 образцах первичной опухоли пациентов, которые включены в III фазу клинических исследований, было установлено, что избыточная экспрессия *TOP2α* при лечении больных доксорубицином сопряжена с более вероятным ответом на лечение [(OR, 95% доверительный интервал 1,09 (1,03—1,15, $p=0,002$)] [57]. В работе шведских учёных была показана сопряжённость амплификации локуса *TOP2a* с хорошим ответом на антрациклиносодержащие схемы НАХТ [58]. Было показано, что при сверхэкспрессии *TOP2a*, по данным ИГХ и FISH, опухоли молочной железы показывали значительно более высокую частоту полных морфологических регрессий при проведении НАХТ и более высокую частоту ответа (полная + частичная регрессия) на антрациклиносодержащие схемы лечения [59, 60].

Заключение

Персонализация химиотерапии остается важной и актуальной проблемой для немелкоклеточного рака лёгкого, решение которой может способствовать значительному повышению эффективности терапии НМРЛ. Как было показано во многих исследованиях, гены монорезистентности являются важными предиктивными маркерами для персонализации химиотерапии больных раком лёгкого. К сожалению, большинство работ являются ретроспективными и сосредоточены на изучении роли единичных генов монорезистентности и их связи с эффективностью

отдельных химиопрепаратов. Тем не менее на основании вышесказанного, использование уровня экспрессии генов *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TYMS* и *TUBB3* в качестве предиктивных маркеров для назначения химиопрепаратов, выглядит достаточно обоснованным для разработки и клинической апробации в проспективных исследованиях алгоритмов персонализированного назначения химиотерапии больным раком лёгкого.

В 2014 г. в Томском НИИ онкологии было начато такое проспективное исследование с использованием для персонализации назначения адъювантной химиотерапии больным НМРЛ во II—III стадии уровня экспрессии в опухоли генов монорезистентности: *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TYMS* и *TUBB3*. Был разработан алгоритм принятия решения о персонализированном назначении схемы адъювантной химиотерапии в зависимости от маркёрного уровня экспрессии этих генов в опухолевой ткани лёгкого каждого больного после неоадъювантной химиотерапии по схеме винорельбин+карбоплатин. В зависимости от уровня их экспрессии принимается решение о назначении в адъюванте вместе с карбоплатином гемзара, винорельбина, доксорубицина, иринотекана или фторурацила.

К настоящему моменту персонализированное назначение адъювантной химиотерапии проведено 35 больным НМРЛ, и предварительные результаты свидетельствуют о значительном повышении эффективности лечения больных НМРЛ. Отмечается весьма существенный прирост однолетней безрецидивной выживаемости больных с использованием персонализированной схемы АХТ, по сравнению с группой исторического контроля (больные со схемой винорельбин+карбоплатин в неоадъюванте и в адъюванте). Интересно заметить, что с увеличением выборки, которое продолжается и в настоящее время, увеличивается и прирост безрецидивной выживаемости. Представляется важным формирование по данной тематике многоцентрового исследования совместно с другими НИИ онкологии и онкологическими диспансерами, которое будет с валидацией на международном уровне и авторы статьи приглашают к сотрудничеству всех заинтересованных лиц.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № НК14-04-31633\15 и поддержана программой повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского государственного университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scagliotti G.V., Pastorino U., Vansteenkiste J.F., Spaggiari L., Facciolo F., Orlovski T.M., Maiorino L., Hetzel M., Leschinger M., Visseren-Grul C. Randomized phase III study of surgery alone or surgery plus preoperative cisplatin and gemcitabine in stages IB to IIIA non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2: 172—178.
2. Vansteenkiste J., De Ruysscher D., Eberhardt W., Lim E., Senan S., Felip E., Peters S. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol* 2013; 241.
3. Depierre A., Westeel V., Jacoulet P. Preoperative chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* 2001; 27: 2: 119—127.

4. *Felip E., Massuti B., Alonso G., González-Larriba J., Camps C., Isla D., Costas E., Sánchez J., Griesinger F., Rosell R.* Surgery (S) alone, preoperative (preop) paclitaxel/carboplatin (PC) chemotherapy followed by S, or S followed by adjuvant (adj) PC chemotherapy in early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of the NATCH multicenter, randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 7500.
5. *Lan J., Huang H.-Y., Lee S.-W., Chen T.-J., Tai H.-C., Hsu H.-P., Chang K.-Y., Li C.-F.* TOP2A overexpression as a poor prognostic factor in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tum Biol* 2014; 35: 1: 179–187.
6. *Wei C.H., Gorgan T.R., Elashoff D.A., Hines O.J., Farrell J.J., Donahue T.R.* A meta-analysis of gemcitabine biomarkers in patients with pancreatico-biliary cancers. *Pancreas* 2013; 42: 8.
7. *Shatokhina S.N., Zakharova N.M., Dedova M.G., Sambulov V.I., Shabalin V.N.* Morphological marker of tumor progression in laryngeal cancer. *Voprosy onkologii* 2013; 59: 2: 66–70.
8. *Fung K.L., Tepede A.K., Pluchino K.M., Pouliot L.M., Pixley J.N., Hall M.D., Gottesman M.M.* Uptake of compounds that selectively kill multidrug-resistant cells: the copper transporter SLC31A1 (CTR1) increases cellular accumulation of the thiosemicarbazone NSC73306. *Mol Pharmacol* 2014; 11: 8: 2692–2702.
9. *Li J., Li Z.N., Du Y.J., Li X.Q., Bao Q.L., Chen P.* Expression of MRP1, BCRP, LRP, and ERCC1 in advanced non-small-cell lung cancer: correlation with response to chemotherapy and survival. *Clin Lung Cancer* 2009; 10: 6: 414–421.
10. *Kalikaki A., Voutsina A., Koutsopoulos A., Papadaki C., Sfakianaki M., Yachnakis E., Xyrakis A., Kotsakis A., Agelaki S., Souglakos J.* ERCC1 SNPs as potential predictive biomarkers in non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Investigat* 2015.
11. *De Dosso S., Zanellato E., Nucifora M., Boldorini R., Sonzogni A., Biffi R., Fazio N., Bucci E., Beretta O., Crippa S.* ERCC1 predicts outcome in patients with gastric cancer treated with adjuvant cisplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72: 1: 159–165.
12. *Park K.W., Jung E.-S., Kim D.-G., Yoo Y.-K., Hong T.-H., Lee I.S., Koh Y.H., Kim J.-H., Lee M.A.* ERCC1 can be a prognostic factor in hilar cholangiocarcinoma and extrahepatic bile duct cancer, but not in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res Treat* 2013; 45: 1: 63–69.
13. *Yuanming L., Lineng Z., Baorong S., Junjie P., Sanjun C.* BRCA1 and ERCC1 mRNA levels are associated with lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013; 13: 1: 103.
14. *Yan D., Wei P., An G., Chen W.* Prognostic potential of ERCC1 protein expression and clinicopathologic factors in stage III/N2 non-small cell lung cancer. *J Cardiothorac Surg* 2013; 8: 149.
15. *Tiseo M., Bordi P., Bortesi B., Boni L., Boni C., Baldini E., Grossi F., Recchia F., Zanelli F., Fontanini G.* ERCC1/BRCA1 expression and gene polymorphisms as prognostic and predictive factors in advanced NSCLC treated with or without cisplatin. *Brit J Cancer* 2013; 108: 8: 1695–1703.
16. *Han Y., Wang X.-B., Xiao N., Liu Z.-D.* mRNA expression and clinical significance of ERCC1, BRCA1, RRM1, TYMS and TUBB3 in postoperative patients with non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 5: 2987–2990.
17. *Beppler G., Williams C., Schell M.J., Chen W., Zheng Z., Simon G., Gadgeel S., Zhao X., Schreiber F., Brahmer J.* Randomized international phase III trial of ERCC1 and RRM1 expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; JCO. 2012.46. 9783.
18. *Olaussen K.A., Dunant A., Fouret P., Brambilla E., André F., Haddad V., Taranchon E., Filipits M., Pirker R., Popper H.H.* DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *New England J Med* 2006; 355: 10: 983–991.
19. *Kaira K., Takahashi T., Murakami H., Shukuya T., Kenmotsu H., Ono A., Naito T., Tsuya A., Nakamura Y., and Endo M.* The role of β III-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated by taxane-based chemotherapy. *Intern J Clin Oncol* 2013; 18: 3: 371–379.
20. *Leng X.-F., Chen M.-W., Xian L., Dai L., Ma G.-Y., Li M.-H.* Combined analysis of mRNA expression of ERCC1, BAG-1, BRCA1, RRM1 and TUBB3 to predict prognosis in patients with non-small cell lung cancer who received adjuvant chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 1: 25.
21. *Reiman T., Lai R., Veillard A., Paris E., Soria J., Rosell R., Taron M., Graziano S., Kratzke R., Seymour L.* Cross-validation study of class III β -tubulin as a predictive marker for benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer: analysis of four randomized trials. *Ann Oncol* 2011; 33.
22. *Levallet G., Bergot E., Antoine M., Creveuil C., Santos A.O., Beau-Faller M., De Fraipont F., Brambilla E., Levallet J., Morin F.* High TUBB3 expression, an independent prognostic marker in patients with early non-small cell lung cancer treated by preoperative chemotherapy, is regulated by K-Ras signaling pathway. *Mol Cancer Therapeut.* 2012; 11: 5: 1203–1213.
23. *Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E., Sørensen J.B.* Use of TUBB3 for patient stratification and prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* 2015; 4: 2: 97–110.
24. *Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Ritzel R.G., Mowles D.A., Carpenter P., Chen X.-Z.* Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem.* 2001; 276: 4: 2914–2927.
25. *Oguri T., Achiwa H., Sato S., Bessho Y., Takano Y., Miyazaki M., Muramatsu H., Maeda H., Niimi T., Ueda R.* The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Therapeut* 2006; 5: 7: 1800–1806.
26. *Heinemann V., Xu Y.-Z., Chubb S., Sen A., Hertel L.W., Grindey G.B., Plunkett W.* Cellular elimination of 2', 2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res* 1992; 52: 3: 533–539.
27. *Plunkett W., Huang P., Xu Y.-Z., Heinemann V., Grunewald R., Gandhi V.* Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. in *Seminars in oncology*. 1995.
28. *Liu Z.-Q., Han Y.-C., Zhang X., Chu L., Fang J.-M., Zhao H.-X., Chen Y.-J., Xu Q.* Prognostic value of human equilibrative nucleoside transporter in pancreatic cancer receiving gemcitabine-based chemotherapy: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9: 1: 87–103.
29. *Farrell J.J., Elsaleh H., Garcia M., Lai R., Ammar A., Regine W.F., Abrams R., Benson A.B., Macdonald J., Cass C.E.* Human equilibrative nucleoside transporter levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 1: 187–195.
30. *Ward J.L., Sherali A., Mo Z.-P., Tse C.-M.* Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells ENT2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J Biol Chem* 2000; 275: 12: 8375–8381.
31. *Hagmann W., Jesnowski R., Faissner R., Guo C., Löhr J.M.* ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines: upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatology* 2009; 9: 1: 136–144.
32. *Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G.* 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 5: 330–338.
33. *Yu Y., Ding S., Liang Y., Zheng Y., Li W., Yang L., Zheng X., Jiang J.* Expression of ERCC1, TYMS, TUBB3, RRM1 and TOP2A in patients with esophageal squamous cell carcinoma: A hierarchical clustering analysis. *Exper Ther Med* 2014; 7: 6: 1578–1582.
34. *Aoki Y., Sakagawa K., Hihara J., Emi M., Hamai Y., Kono K., Shi L., Sun J., Kitao H., Ikura T.* Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. *Intern J Oncol* 2013; 42: 6: 1951–1960.
35. *Trahtenberg A.H., Kolbanov K.I.* Lung cancer. *Atmosphere Pulmonol Allergol* 2008; 4: 3–9.
36. *Chissow V.I., Darjalova S.L.* Oncology (clinical guidelines).M.: Gjeotar-Media; 2006; 638.
37. *Kim B., Fatayer H., Hanby A.M., Horgan K., Perry S.L., Valleley E.M., Verghese E.T., Williams B.J., Thorne J.L., Hughes T.A.* Neoadjuvant chemotherapy induces expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease-free survival in breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8: 5: 627–666.
38. *Iusuf D., Teunissen S.F., Wagenaar E., Rosing H., Beijnen J.H., and Schinkel A.H.* P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *J Pharmacol Exper Ther* 2011; 337: 3: 710–717.
39. *Jeiri I.* Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet* 2012; 27: 1: 85–105.
40. *Buenos R., Farber D., D'ami T.A., Demmy M., Steven J., Feigenberg M., Frederic W., and Krisá G.* Non-small cell lung cancer. *Recom Diagn Treat Lung Cancer.* 2006; 2: 42–70.
41. *Litman T., Druley T., Stein W., Bates S.* From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellul Mol Life Scien CMLS.* 2001; 58: 7: 931–959.
42. *Leith C.P., Kopecky K.J., Chen I.-M., Eijdens L., Slovak M.L., McConnell T.S., Head D.R., Weick J., Grever M.R., Appelbaum F.R.* Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia. *A Southwest Oncology Group Study Blood* 1999; 94: 3: 1086–1099.
43. *Amiri-Kordestani L., Basseville A., Kurdziel K., Fojo A.T., Bates S.E.* Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Res Updates* 2012; 15: 1: 50–61.
44. *Tang S.C., Lankheet N.A., Poller B., Wagenaar E., Beijnen J.H., Schinkel A.H.* P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein

- (ABCG2) restrict brain accumulation of the active sunitinib metabolite N-desethyl sunitinib. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012; 341: 1: 164–173.
45. Tsurutani J., Nitta T., Hirashima T., Komiya T., Uejima H., Tada H., Syunichi N., Tohda A., Fukuoka M., Nakagawa K. Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Lung Cancer* 2002; 35: 3: 299–304.
 46. Kanzawa F., Sugimoto Y., Minato K., Kasahara K., Bungo M., Nakagawa K., Fujiwara Y., Liu L.F., Saijo N. Establishment of a camptothecin analogue (CPT-11)-resistant cell line of human non-small cell lung cancer: characterization and mechanism of resistance. *Cancer Res* 1990; 50: 18: 5919–5924.
 47. Nygård S.B., Christensen I.J., Nielsen S.L., Nielsen H.J., Brünner N., Spindler K.-L.G. Assessment of the topoisomerase I gene copy number as a predictive biomarker of objective response to irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2013; 49: 1: 84–91.
 48. Kümler I., Balslev E., Stenvang J., Brünner N., Nielsen D. A phase II study of weekly irinotecan in patients with locally advanced or metastatic HER2-negative breast cancer and increased copy numbers of the topoisomerase I (TOP1) gene: a study protocol. *BMC Cancer* 2015; 15: 1: 78.
 49. Grunnet M., Calatayud D., Schultz N.A., Hasselby J.P., Mau-Sørensen M., Brünner N., Stenvang J. TOP1 gene copy numbers are increased in cancers of the bile duct and pancreas. *Scand J Gastroenterol* 2015; 0: 1–10.
 50. Vulsteke C., Lambrechts D., Dieudonné A., Hatse S., Brouwers B., Van Brussel T., Neven P., Belmans A., Schöffski P., Paridaens R. Genetic variability in the multidrug resistance associated protein-1 (ABCC1/MRP1) predicts hematological toxicity in breast cancer patients receiving (neo-) adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (FEC). *Ann Oncol* 2013; 24: 6: 1513–1525.
 51. Lacave R., Coulet F., Ricci S., Touboul E., Flahault A., Rateau J., Cesari D., Lefranc J., Bernaudin J. Comparative evaluation by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of MDR1, MRP and GSTp gene expression in breast carcinomas. *Brit J Cancer* 1998; 77: 5: 694.
 52. Korman D.B. Fundamentals of anticancer chemotherapy. M.: Practical medicine; 2006; 512.
 53. Leivonen S.-K., Rokka A., Östling P., Kohonen P., Corthals G.L., Kallioniemi O., Perälä M. Identification of miR-193b targets in breast cancer cells and systems biological analysis of their functional impact. *Mol Cell Prot* 2011; 10: 7: 110.
 54. Litviakov N.V., Garbukov E.Yu., Slonimskaya E.M., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Vtorushin S.V., Christenko K.Yu., Zavyalova M.V., Cherdynseva N.V. Correlation of metastasis-free survival in breast cancer patients and an expression vector of multidrug resistance genes in tumor during neoadjuvant chemotherapy. *Voprosy Onkologii*. 2013; 3: 59: 334–340.
 55. Litviakov N.V. Gradient phenomenon of multidrug resistance gene expression in breast cancer. *Siber J Oncol* 2013; 4: 58: 5–11.
 56. Abuhammad S., Zihliff M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics* 2013; 101: 4: 213–220.
 57. Durbecq V., Paesmans M., Cardoso F., Desmedt C., Di Leo A., Chan S., Friedrichs K., Pinter T., Van Belle S., Murray E. Topoisomerase-II-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.
 58. Orlando L., Del Curto B., Gandini S., Ghisini R., Pietri E., Torrisi R., Balduzzi A., Cardillo A., Dellapasqua S., Veronesi P. Topoisomerase II-gene status and prediction of pathological complete remission after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in endocrine non-responsive Her2/neu-positive breast cancer. *The Breast* 2008; 17: 5: 506–511.
 59. Miyoshi Y., Kurosumi M., Kurebayashi J., Matsuura N., Takahashi M., Tokunaga E., Egawa C., Masuda N., Kono S., Morimoto K. Predictive factors for anthracycline-based chemotherapy for human breast cancer. *Breast Cancer* 2010; 17: 2: 103–109.
 60. Kawachi K., Sasaki T., Murakami A., Ishikawa T., Kito A., Ota I., Shimizu D., Nozawa A., Nagashima Y., Machinami R. The topoisomerase II alpha gene status in primary breast cancer is a predictive marker of the response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy. *Pathol-Res Pract* 2010; 206: 3: 156–162.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Цыганов М. М. — аспирант, Томский НИИ онкологии, Томск

Родионов Е. О. — аспирант, Томский НИИ онкологии, Томск

Миллер С. В. — д. м. н., Томский НИИ онкологии, Томск
Литвяков Н. В. — д. б. н., Томский НИИ онкологии, Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

Методы и средства купирования побочного действия вируса вакцины при оспопрививании

Н. К. ЧЕРНИКОВА, Т. А. БОНДАРЕВА, С. В. БОРИСЕВИЧ, В. Н. ПОДКУЙКО, А. Л. ХМЕЛЕВ, Т. В. ДОРОХИНА

Филиал ФГУ «48 Центральный НИИ Минобороны России» — «Вирусологический центр», Сергиев Посад

Methods and Means for Defense from Collateral Action of Vaccine Virus after Vaccination Against Smallpox

N. K. CHERNIKOVA, T. A. BONDAREVA, S. V. BORISEVICH, V. N. PODKUJKO, A. L. KHMELYEV, T. V. DOROKHINA

Central Research Institute No. 48 of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad

В связи с актуальностью возврата к оспопрививанию обсуждаются средства и методы повышения безопасности первичной иммунизации живыми оспенными вакцинами.

Ключевые слова: оспенная вакцина, побочное действие, вакцинальные реакции, профилактика, лечение.

In connection with actuality of smallpox vaccination at present its methods and means are discussed to increase the safety of the first immunization with live vaccines.

Key words: smallpox vaccine, collateral action, postvaccinal responses, prophylaxis, treatment.

Актуальность проблемы

После глобальной ликвидации натуральной оспы с 1980 г. в России прекращена вакцинация против возбудителя этой инфекции. Однако в настоящее время, когда существенно возросла реальная угроза террористических актов, в том числе с применением биологических агентов, среди которых вирус натуральной оспы занимает первое место, возникает необходимость возобновления оспопрививания сотрудников специальных подразделений, медработников и населения России в целом [1, 2]. В пользу его возобновления свидетельствуют также факты заражения людей другими возбудителями ортопоксвирусных инфекций, таких как оспа обезьян, коров, верблюдов, и др. [3, 4].

Единственными эффективными средствами защиты против ортопоксвирусов, патогенных для человека, являются живые вакцины [5]. Однако первичная иммунизация взрослых людей разрешённой для этих целей сухой оспенной вакциной для накожного применения может привести к развитию серьёзных реакций и осложнений [6, 7].

В России зарегистрирована и разрешена для ревакцинации взрослых людей таблетированная эмбриональная живая вакцина для орального применения ТЭОВак [8]. Иммунизация ТЭОВак в условиях ревакцинации более безвредна по сравне-

нию с накожной вакциной, эпидемически безопасна и менее реактогенна [9], поэтому указанный препарат целесообразно внедрить в практику вакцинации как препарат для первичной иммунизации взрослых людей. Тем не менее, как показали клинические испытания в 2003—2005 гг., ТЭОВак может вызывать вакцинальные реакции в виде язвенно-некротических тонзиллитов [10].

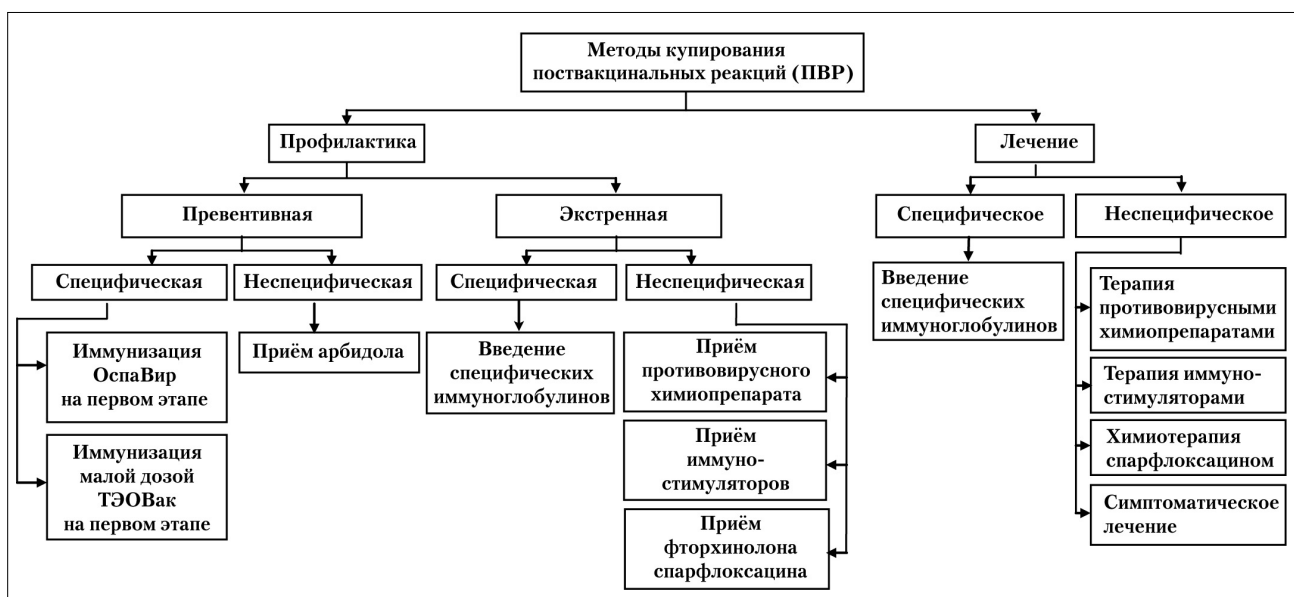
Для поиска путей безопасной иммунизации населения в современных условиях был проведён анализ методов и средств купирования поствакцинальных реакций, вызванных побочным действием вируса вакцины (рисунок).

Одной из причин реактогенности живых вакцин является повышенный уровень остаточной вирулентности вакцинных штаммов [11]. Влияя на проявление остаточной вирулентности штамма в процессе формирования иммунного ответа в макроорганизме, можно существенно снизить побочное действие препарата и, в первую очередь, его реактогенность. Желаемого эффекта можно добиться путём создания специфического грундиммунитета путём предшествующего введения вакцин и специфических иммуноглобулинов, стимуляцией факторов неспецифической резистентности организма или воздействием на репродукцию вакцинного штамма вируса противовирусными химиопрепаратами.

Ещё до отмены оспопрививания превентивную специфическую профилактику в ряде случаев проводили двухэтапным методом иммунизации, включающим последовательную вакцинацию инактиви-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 141306 Московская обл., Сергиев Посад-6. 48 Центральный НИИ



Методы купирования побочного вируса вакцины в составе ТЭОВак.

рованными и живым препаратами. Вакцинальный процесс при двухэтапном методе протекал более легко, чем при иммунизации обычным способом. Частота неврологических осложнений первично привитых, 90% из которых составляли лица старших возрастных групп, была в 7 раз меньше, чем у детей декретированного возраста, привитых только одной живой вакциной, и в 6,2 раз меньше по сравнению с иммунизированными под защитой специфического иммуноглобулина человека [12, 13]. Количество общих средних реакций при двухэтапном методе снижалось в 6 раз, лимфаденитов — в 13 раз, энцефалитов — от 8 до 10 раз [14].

В настоящее время налажен выпуск инактивированного препарата «ОспаВир» [14, 15], который испытан в условиях двухэтапной кожной иммунизации взрослых людей при введении в дозе 50 мкг за 7 сут до иммунизации живой вакциной. Установлена умеренная реактогенность, безвредность и высокая иммуногенность данного метода. Местные и общие прививочные реакции протекали в лёгкой форме и проходили самостоятельно без медицинского вмешательства [14, 16]. Нами в эксперименте на животных было показано, что введение ОспаВир в той же дозе за 7 сут до иммунизации ТЭОВак не снижало эффективность живой вакцины (неопубликованные данные) (таблица).

Аналогичным подходом к специфической профилактике реактогенности может быть двукратная иммунизация нарастающими дозами живой вакцины. Препарат Ревакс — ВТ, разработанный на основе таблетированной оспенной вакцины, при аналогичном введении с интервалом 1—2 нед. был безвреден и не уступал по им-

муногенности живой сухой оспенной вакцине для кожного применения [17].

С целью профилактики и лечения поствакцинальных последствий при оспопрививании ослабленных детей ранее широко использовали специфический иммуноглобулин человека [18]. Его применение в этих целях остается актуальным и в настоящее время [19], но в силу объективных причин потребности в этом препарате в случае возобновления обязательного оспопрививания могут превысить возможности его выпуска. Поэтому при лечении поствакцинальных реакций альтернативой ему может стать иммуноглобулин противооспенный из сыворотки крови лошадей [20]. В Вирусологическом Центре в опытах на животных показано, что гетерологичный иммуноглобулин снижал уровень накопления вируса вакцины в органах при однократном введении морским свинкам и кроликам на 3 сут после вакцинации ТЭОВак, а также доказана его эффективность как лечебного препарата при оспе кроликов (неопубликованные данные).

Из средств неспецифической экстренной профилактики до отмены обязательных прививок против натуральной оспы для безопасности противооспенной вакцинации ослабленных детей использовали химиопрепарат метисазон [21]. Поскольку его выпуск давно прекращён, целесообразно оценить возможность применения для этих целей других препаратов подобного действия. За рубежом предложено использовать цидофовир (шифр (СМХ001) — (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine, показавший эффективность против ортопоксвирусов [22], а

Средства купирования побочного действия вируса вакцины в составе ТЭОВак

Название	Фирма-производитель, страна	Доза	Кратность введения	Способ введения	Срок применения относительно вакцинации
Специфическая превентивная профилактика					
ОспаВир (Вакцина оспенная инактивированная), лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения	ФГУП НПО «Микроген», Россия	50 мкг общего белка	Однократно	Подкожный	За 7 сут
Неспецифическая превентивная профилактика					
Арбидол*	ОАО «Фарма-Стандарт-Лекарства», Россия	10 мг/кг	Однократно	Пероральный	За 1 сут
Специфическая экстренная профилактика					
Иммуноглобулин человека противооспенный, раствор для внутримышечного введения	ФГУП НПО «Микроген», Россия	3 мл	Однократно	Внутримышечный	Одновременно
Неспецифическая экстренная профилактика					
Ридостин*	ЗАО «Вектор-Медика», Россия	5 мг/кг	Однократно	Интраназальный	На 4 сут после
Спарфлоксацин*	«Dr.Reddy's Laboratories», Индия	200 мг/сут	Однократно	Пероральный	Одновременно
Специфическое лечение					
Иммуноглобулин человека противооспенный, раствор для внутримышечного введения	ФГУП НПО «Микроген», Россия	0,5—1,0 мл/кг в сутки	Множественно	Внутримышечный	При появлении симптомов средних и тяжёлых ПВР
Иммуноглобулин противооспенный из сыворотки крови лошадей*	Филиал ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ»	3 мл	Однократно	Внутримышечный	При появлении симптомов средних и тяжёлых ПВР
Неспецифическое лечение					
Арбидол*	ОАО «Фарма-Стандарт-Лекарства», Россия	10 мг/кг	Однократно	Пероральный	При появлении симптомов средних и тяжёлых ПВР
Ридостин*	ЗАО «Вектор-Медика», Россия	5 мг /кг	Однократно	Интраназальный	То же
Спарфлоксацин*	«Dr.Reddy's Laboratories», Индия	200 мг/сут	1 раз в сутки в течение 5 дней	Пероральный	То же

Примечание. * — проведено доклиническое изучение действия препаратов. Все препараты, за исключением иммуноглобулина противооспенного из сыворотки крови лошадей, имеют разрешение к медицинскому применению в РФ.

также тилифовир (шифр ST-246) — {4-trifluoromethyl-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[*f*] isoindol-2(1H)-yl)-benzamide} [23], Последний в 8000 раз эффективнее, чем цидофовир. Кроме того, перспективными пероральными препаратами являются N-метаноксикарбатимидин (N-MCT) и SRI21950 (4*-тио-производное иододеоксиуридина). Еще одно соединение — НРМО-DAPy — является активным. Но только при парентеральном введении [24].

Повысить уровень неспецифической резистентности макроорганизма можно с помощью иммуномодуляторов. Купирования поствакцинальных реакций при накожном оспопрививании животных достигали с помощью индуктора интерферона ридостина [25]. Сотрудниками Вирусологического центра наибольший профилактический эффект блокирования остаточной ви-

рулентности вируса вакцины в составе ТЭОВак в эксперименте был показан при профилактическом пероральном применении арбидола в дозе 10 мг/кг массы за 24 ч до вакцинации а также при интраназальном введении ридостина в дозе 5 мг/кг массы на 4 сут после неё. Оба указанных препарата были также эффективны при введении по лечебной схеме (неопубликованные данные).

Существенное влияние на реактогенность ТЭОВак оказывает наличие у прививаемых бактериальных хронических инфекций. Предотвратить реакцию такой этиологии можно превентивным воздействием на бактериальную микрофлору полости рта. При проведении клинических испытаний для лечения язвенно-некротических тонзиллитов успешно использовали антибиотики в комплексе с иммуномодуляторами [10]. Нами экспериментально установлено,

что современный пероральный антимикробный препарат фторхинолонового ряда спарфлоксацин не влияет на иммуногенность ТЭОВак для морских свинок и кроликов при одновременном введении с вакциной, а также при лечебной схеме применения, что позволяет предложить его использование при проведении новых клинических испытаний ТЭОВак.

Помимо предложенных способов купирования побочного действия вируса вакцины в составе живых оспенных вакцин существует возможность снижения его негативного влияния на макроорганизм за счёт получения вакцин на основе более безопасных аттенуированных штаммов вируса вакцины, например, таких как MVA или LC16M8 [26]. В отношении ТЭОВак указанный путь также вполне реален, поскольку штамм Б-51 представлен гетерогенной популяцией вирионов, и выделенный из него клон Б-51 БМ характеризуется более низким уровнем остаточной вирулентности по сравнению с исходным штаммом [27].

Качество оспенных вакцин существенно повышается при использовании более безопасного и технологичного субстрата накопления вируса — культуры клеток [28]. Создание культуральных препаратов для пероральной иммунизации является еще одним путём снижения их реактогенности [7].

Одним из современных направлений развития вакцинопрофилактики является создание генно-инженерных рекомбинантных и ДНК-вакцин [29–32]. В отношении оспопрививания неплохо зарекомендовала себя отечественная рекомбинантная оспенно-гепатитная вакцина Ревакс-ВТ, а также зарубежная рекомбинантная ДНК-вакцина. Первая прошла клинические испытания, вторая — полный цикл доклинической оценки [17, 33].

На примере препарата «Гриппол» показано, что включение в вакцину иммуномодуляторов позволяет скорректировать иммунный статус прививаемых, за счёт чего повышается иммуногенность специфического антигена и безопасность вакцинации [34]. Включение интерлейкинов во вновь разрабатываемые рекомбинантные оспенные вакцины также улучшало их качество [35, 36].

Экспериментально установлено, что использование при конструировании вакцинных препаратов систем доставки антигенов типа микрокап-

сул или липосом обеспечивает процесс постепенного высвобождения антигена в организме, что делает процесс иммунизации более мягким и безопасным [37].

Сочетание всех перечисленных выше направлений может привести к разработке нового типа оспенных вакцин, например, культуральных интегральных (комбинированных) препаратов для перорального применения на основе безопасного вакцинного штамма или рекомбинантных поливакцин, содержащих иммуномодуляторы с системой доставки, обеспечивающей их пролонгированное действие на период развития возможных осложнений. Такие вакцины будут безопасны и эффективны.

Таким образом, обсуждаемые пути предотвращения серьёзных вакцинальных реакций могут решить проблему первичной иммунизации взрослого населения безопасным и эффективным препаратом ТЭОВак, а рекомендуемые средства могут быть предложены для лечения поствакцинальных реакций и осложнений. При этом обеспечивается сохранение иммуногенности вакцины. Указанные методы и средства снижения реактогенности не взаимоисключают, а взаимодополняют друг друга. Выбор того или иного средства определяется наличием препаратов, конкретной ситуацией, особенностями контингента, состоянием иммунореактивности прививаемого. Не исключается совместное применение нескольких средств, в частности иммуномодуляторов и антибиотика спарфлоксацина. Особенно актуально применение данных методов и средств для лиц с изменённой иммунореактивностью, имеющих противопоказания к вакцинации. В перспективе целесообразно создание нового типа оспенных вакцин, например, культуральных интегральных (комбинированных) препаратов для перорального применения на основе безопасного вакцинного штамма или рекомбинантных поливакцин, содержащих иммуномодуляторы с системой доставки, обеспечивающей их пролонгированное действие на период развития возможных осложнений. Такой препарат позволил бы поддерживать популяционный иммунитет к натуральной оспе на уровне, исключающем трансмиссию возбудителя, и проблема возврата этой инфекции была бы решена полностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г., Максимов В.А., Воробьев А.А. и др. Актуальность возврата к оспопрививанию: Проблемы и перспективы. Вестн РАМН 2006; 7: 32–38. / Onishchenko G.G., Maksimov V.A., Vorob'ev A.A. i dr. Aktual'nost' vozvrata k ospoprivivaniyu: Problemy i perspektivy. Vestn RAMN 2006; 7: 32–38. [in Russian]
2. Львов Д.К., Зверев В.В., Гинзбург А.Л. и др. Натуральная оспа — дремлющий вулкан. Вopr вирусол 2008; 4: 4–8. / L'vov D.K., Zverev V.V., Ginzburg A.L. i dr. Natural'naja ospa — dremljushhij vulkan. Vopr virusol 2008; 4: 4–8. [in Russian]
3. Rimoin A.W., Kibela N., Kibela-Ilunga et al. Endemic human monkey, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. Emerg Infect Dis 2007; 13: 934–937.

4. Campe H., Zimmermann P., Glos K. et al. Cowpox virus transmission from Pet Rats to humans, France Emerg Infect Dis 2009; 15: 5: 781–784.
5. Онищенко Г.Г. Иммунопрофилактика — достижения и задачи по дальнейшему совершенствованию. Журн микробиол 2006; 3: 58–62. / Onishchenko G.G. Immunoprofilaktika — dostizhenija i zadachi po dal'nejshemu sovershenstvovaniju. Zhurn mikrobiol 2006; 3: 58–62. [in Russian]
6. Frieden T., Mostashari F., Schwartz S.P. et al. Cardiac deaths after a mass smallpox vaccination — New York, 1947. MMWR 2003; 52: 39: 933–936.
7. Wiser I., Balicer R.D., Cohen D. An update on smallpox vaccine candidates and their role in bioterrorism related vaccination strategies. Vaccine 2007; 25: 976–984.

8. ТЭОВак (Вакцина оспенная эмбриональная живая), таблетки жевательные: ФСП 42-0906-07 и таблетки, покрытые оболочкой делимые ФСП: 42-8420-07. ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». Введ. 19.02.2007 г. / ТЭОВак (Vakcina ospennaja jembrional'naja zhivaja), tabletki zhevatel'nye: FSP 42-0906-07 i tabletki, pokrytye obolochkoj delimye FSP: 42-8420-07. FGU «48 CNII Minoborony Rossii». Vved. 19.02.2007 g. [in Russian]
9. Воробьев А.А., Подкуйко В.Н., Михайлов В.В. Итоги фундаментальных и прикладных исследований по пероральной иммунизации против натуральной оспы. Журн микробиол 2002; 1: 12—18. / Vorob'ev A.A., Podkujko V.N., Mihajlov V.V. Itogi fundamental'nyh i prikladnyh issledovanij po peroral'noj immunizacii protiv natural'noj ospy. Zhurn mikrobiol 2002; 1: 12—18. [in Russian]
10. Бондарев В.П., Борисевич И.В., Мельников С.А. и др. Опыт применения антибиотиков для лечения язвенно-некротических тонзиллитов, развившихся на фоне вакцинации ТЭОВак. Антибиотики и химиотер 2010; 55: 3—4: 21—23. / Bondarev V.P., Borisevich I.V., Mel'nikov S.A. i dr. Opyt primeneniya antibiotikov dlja lechenija jazvenno-nekroticheskikh tonsillitov, razvivshih'sja na fone vakcinacii TjeOVak. Antibiotiki i himioter 2010; 55: 3—4: 21—23. [in Russian]
11. Пишеничнов В.А., Воробьев А.А., Балаева Н.М. Аттенуация вирусов и риккетсий. М.: 1976; 191. / Pshenichnov V.A., Vorob'ev A.A., Balaeva N.M. Attenuacija virusov i rikketsij. M.: 1976; 191. [in Russian]
12. Соколова А.Ф. Двухэтапный метод вакцинации детей против оспы. Профилактическая вакцинация и её влияние на детский организм. Л.: 1975; 65—66. / Sokolova A.F. Dvuhjetapnyj metod vakcinacii detej protiv ospy. Profilakticheskaja vakcinacija i ee vlijanie na detskij organizm. L.: 1975; 65—66. [in Russian]
13. Маренникова С.С., Мацевич Г.П., Соколова А.Ф. Иммунологическая характеристика двухэтапного метода иммунизации против оспы. Журн микробиол 1977; 5: 105—109. / Marennikova S.S., Macevich G.P., Sokolova A.F. Immunologicheskaja harakteristika dvuhjetapnogo metoda immunizacii protiv ospy. Zhurn mikrobiol 1977; 5: 105—109. [in Russian]
14. Гаврилова М.А., Шкуратова О.В., Мальцева Г.Г. и др. ОспаВир — новый препарат для первичной вакцинации против натуральной оспы двухэтапным методом: Сибир мед журн 2009; 24: 2: 63—67. / Gavrilova M.A., Shkuratova O.V., Mal'ceva G.G. i dr. OspaVir — novyj preparat dlja pervichnoj vakcinacii protiv natural'noj ospy dvuhjetapnym metodom: Sibir med zhurn 2009; 24: 2: 63—67. [in Russian]
15. Вакцина оспенная инактивированная (ОспаВир), лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения: ФСП 42-0504-1124-07 / ФГУП «НПО Микроген». Введ. 20.02.2007 г. / Vakcina ospennaja inaktivirovannaja (OspaVir), liofilizat dlja prigotovlenija rastvora dlja podkozhnogo vvedeniya: FSP 42-0504-1124-07 / FGUP «NPO Mikroген». Vved. 20.02.2007 g. [in Russian]
16. Рузавина Е.В., Шкуратова О.В., Ставицкая Н.Х. и др. Изучение реактогенности, безопасности инактивированной вакцины «ОспаВир» и специфической эффективности двухэтапного метода вакцинации против натуральной оспы с применением на втором этапе живой оспенной вакцины. Сибир мед журн 2009; 24: 2: 34—39. / Ruzavina E.V., Shkuratova O.V., Stavickaja N.H. i dr. Izuchenie reaktogennosti, bezopasnosti inaktivirovannoj vakciny «OspaVir» i specificheskoj jeffektivnosti dvuhjetapnogo metoda vakcinacii protiv natural'noj ospy s primeneniem na vtorom jetape zhivoj ospennoj vakciny. Sibir med zhurn 2009; 24: 2: 34—39. [in Russian]
17. Плясунов И.В., Сергеев А.Н., Мельников С.А. и др. Клиническое исследование рекомбинантной бивакцины «Ревакс-ВТ» против оспы и гепатита В в условиях двукратной оральной вакцинации. Вopr вирусол 2006; 2: 31—35. / Pljasunov I.V., Sergeev A.N., Mel'nikov S.A. i dr. Klinicheskoe issledovanie rekombinantnoj bivakciny «Revaks-VT» protiv ospy i gepatita V v uslovijah dvukratnoj oral'noj vakcinacii. Vopr virusol 2006; 2: 31—35. [in Russian]
18. Исмазова Г.С., Лысункина В.А. Опыт применения гамма-глобулина при прививке против оспы ослабленных детей. Сб. Материалы Всесоюзной конференции по проблемам безопасности вирусных вакцин и вакцинопрофилактики гриппа, оспы и кори. М.: 1972; 37—38. / Ismatova G.S., Lysunkina V.A. Opyt primeneniya gamma-globulina pri privivke protiv ospy oslablennyh detej. Sb. Materialy Vsesojuznoj konferencii po problemam bezopasnosti virusnyh vakcin i vakcinoprofilaktiki grippa, ospy i kori. M.: 1972; 37—38. [in Russian]
19. Мовсесянц А.А., Перекрест В.В. Иммуноглобулин человека противооспенный — средство профилактики и лечения поствакцинальных осложнений. Тезисы Всерос. науч.-практич. конф. «Вакцинология — 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней. М.: 11—12 ноября: 2008; 84—85. / Movsesjanc A.A., Perekrast V.V. Immunoglobulin cheloveka protivooospennyj — sredstvo profilaktiki i lechenija postvakcinal'nyh oslozhnenij. Tezisy Vseros. nauch.-praktich. konf. «Vakcinologija — 2008. Sovershenstvovanie immunobiologicheskikh sredstv profilaktiki, diagnostiki i lechenija infekcionnyh boleznej. M.: 11—12 nojabrja: 2008; 84—85. [in Russian]
20. Гетерологичный противооспенный гамма-глобулин: МРТУ-42 № 150-67/ НИИ санитарии МО СССР. Введ. 10.04 1967 г. / Geterologichnyj protivooospennyj gamma-globulin: MRTU-42 № 150-67/ NII sanitarii MO SSSR. Vved. 10.04 1967 g.
21. Маренникова С.С. Вакцинопрофилактика оспы в современных условиях. Вест АМН СССР 1975; 1: 33—37. / Marennikova S.S. Vakcinoprofilaktika ospy v sovremennyh uslovijah. Vest AMN SSSR 1975; 1: 33—37. [in Russian]
22. Kern E., Hartline C., Harden E. Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication *in vitro* by alkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. Antimicrob Agent Chemother 2002; 46: 4: 991—995.
23. Доклад секретариата ВОЗ УВ126/18 30 декабря 2009 г. / Doklad sekretariata VOZ UV126/18 30 dekabrja 2009 g. [in Russian]
24. Smeets D.F. Progress in the discovery of compounds inhibiting orthopoxviruses in animal models. Antiv Chem Chemother 2008; 19: 3: 115—124.
25. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А. и др. Купирование поствакцинальных осложнений после оспопрививания индукторами интерферона. Антибиотики и химиотер 2010; 53: 1—2: 6—11. / Loginova S.Ja., Borisevich S.V., Maksimov V.A. i dr. Kupirovanie postvakcinal'nyh oslozhnenij posle ospoprivivaniya induktorami interferona. Antibiotiki i himioter 2010; 53: 1—2: 6—11. [in Russian]
26. Rosenthal S.R., Merclinisky M., Klepinger C. et al. Developing new smallpox vaccines. Emerging Infect Dis 2001; 7: 6: 920—926.
27. Бардина Л.И. Характеристика штамма осповакцины Б-51 и выделение из него клонов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Минск: 1969. / Bardina L.I. Harakteristika shtamma ospovakciny B-51 i vydelenie iz nego klonov. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Minsk: 1969.
28. Gullego-Gomez J.C., Risco C., Rodriguez D. et al. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYC8H) of vaccinia virus infected human cells. O Virol 2003; 77: 19: 10606—10622.
29. Sakshatsky P., Wang Sh., Zhang Ch. et al. Immunogenicity and protection efficacy of subunit-based smallpox vaccines using variola major antigens. Virology 2008; 371: 98—107.
30. Святченко В.А., Агапов Е.В., Урманов И.Х. и др. Иммуногенные свойства рекомбинантного вируса осповакцины со встроенной ДНК-копией 26 S РНК вируса ВЭЛ. Вopr вирусол 1993; 5: 222—226. / Svjatchenko V.A., Agapov E.V., Urmanov I.H. i dr. Immunogennnye svojstva rekombinantnogo virusa ospovakciny so vstroennoj DNK-kopiej 26 S RNK virusa VJeL. Vopr virusol 1993; 5: 222—226. [in Russian]
31. Hooper J.W., Thompson E., Wilhelmsen C. et al. Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. J Virol 2004; 78: 9: 4433—4443.
32. Legrand F.A., Verardi P.H., Jones L.A. et al. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses by attenuated vaccinia virus vectors with deleted serpin genes. J Virol 2004; 78: 6: 2770—2779.
33. Hooper J.W., Custer D.M., Thompson E. et al. Four-gene combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. Virology 2003; 306: 181—195.
34. Костинов М.П. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. М.: 2006; 176. / Kostinov M.P. immunokorrekcija vakcinal'nogo processa u lic s narushennym sostojaniem zdorov'ja. M.: 2006; 176. [in Russian]
35. Oh S., Berzofsky J.A., Burke D.S. et al. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 6: 3392—3397.
36. Бабкин И.В., Рязанкин И.Н., Лебедев Л.Р. Иммуногенные свойства рекомбинантного вируса осповакцины, содержащего ген ИЛ-2 человека. Вopr вирусол 2008; 1: 27—31. / Babkin I.V., Rjazankin I.N., Lebedev L.R. Immunogennnye svojstva rekombinantnogo virusa ospovakciny, soderzhashhego gen IL-2 cheloveka. Vopr virusol 2008; 1: 27—31. [in Russian]
37. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: 2004; 150—151. / Medunicyn N.V. Vakcinologija. M.: 2004; 150—151.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., к. м. н., профессор, начальник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

НОВАЯ ЖИЗНЬ СТАРЫХ АНТИБИОТИКОВ.

REVIVING OLD ANTIBIOTICS/U. THEURETZBACHER*, F. VAN BAMBEKE, R. CANTÓN, C. G. GISKE, J. W. MOUTON, R. L. NATION, M. PAUL, J. D. TURNIDGE, G. KAHLMEIER// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 8: 2177—2181.

Перед лицом возрастающей устойчивости к применяемым антибиотикам и недостатка новых становится ясно, что безотлагательно требуются новые подходы. Одним из них является ревизия старых антибиотиков, которая позволит убедиться в их корректном применении, полном использовании их потенциала и определить, могут ли некоторые из них снизить нагрузку на более современные препараты. Настоятельно необходимо усовершенствовать эти лекарства в соответствии с современными стандартами, привнося новые знания в создание регламентных норм и соединяя результаты исследования с клинической практикой. Без системного подхода к модернизации старых лекарств и тщательной проверки их соответствия современным стандартам существует значительный риск причинения вреда больному и нарастания мультилекарственной устойчивости. В статье описаны факторы, которые должны быть приняты во внимание, и намечена последовательность шагов и действий, необходимых для модернизации старых антибиотиков, чтобы сделать их применение в лечении инфекционных заболеваний эффективным.

* Center for Anti-Infective Agents, Eckpergasse 13, 1180 Vienna, Austria.

ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КЛИНИКИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРОСА СПЕЦИАЛИСТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.

CHALLENGES AND SOLUTIONS FOR CLINICAL DEVELOPMENT OF NEW ANTIBACTERIAL AGENTS: RESULTS OF A SURVEY AMONG PHARMACEUTICAL INDUSTRY PROFESSIONALS /E. BETTIOL*, J. D. WETHERINGTON, N. SCHMITT, S. HARBARTHA, FOR THE COMBASTE CONSORTIUM//ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JULY 2015; 59: 7: 3695—3699.

Ввиду того что число выпускаемых антибактериальных препаратов остаётся недостаточным, был произведён анонимный опрос специалистов фарминдустрии по проблемам в области разработки новых препаратов для клиники и их решению. Среди названных проблем на первом месте были проблемы финансовые и регуляторные. В случае микроорганизмов с мультилекарственной устой-

чивостью необходимы тесты для быстрой диагностики, новые регламентные руководства и изменение форматов пограничных значений/испытаний. Регламентирующие органы и инициативные общественно-частные группы доводят указанные проблемы и предлагаемые пути их решения до сведения всех заинтересованных в успехе инвесторов с тем, чтобы обеспечить их поддержку.

*Infection Control Program and Division of Infectious Diseases, Geneva University Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland.

КОЛИСТИН И ФУЗИДИЕВАЯ КИСЛОТА, НОВАЯ ВЫСОКОАКТИВНАЯ СИНЕРГИДНАЯ КОМБИНАЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ACINETOBACTER BAUMANNII С МУЛЬТИЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.

COLISTIN AND FUSIDIC ACID, A NOVEL POTENT SYNERGISTIC COMBINATION FOR TREATMENT OF MULTIDRUG-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII INFECTIONS / L. M. PHEE*, J. W. BETTS, B. BHARATHAN, D. W. WAREHAM//ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2015; 59: 8: 4544—4550.

Распространение *Acinetobacter baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью (MDRAB) привело к «ренессансу» колистина (КОЛ), зачастую единственному препарату, к которому MDRAB остаётся чувствительным. Эффективная терапия КОЛ осложнена непредсказуемостью фармакокинетики, токсичностью и быстрым развитием устойчивости. Сообщается о высокоактивном синергидном взаимодействии КОЛ и фузидиевой кислоты (ФК) в отношении *Acinetobacter baumannii*. Было оценено синергидное действие *in vitro* в отношении 11 MDRAB штаммов диско-диффузионным методом, методом шахматной доски (индекс фракционной ингибиторной концентрации (ИФИК) $\leq 0,5$, индекс пограничной чувствительности (ИПЧ) > 2), и по времени гибели клеток (time-kill, снижение $\geq 2 \log_{10}$ КОЕ/мл). Способность ФК ограничивать развитие устойчивости к КОЛ определяли как в присутствии каждого антибиотика в отдельности, так и их комбинации. Синергидное действие было продемонстрировано в отношении всех штаммов, со средним показателем ИФИК и ИПЧ соответственно 0,064 и 78,85. Согласно данным исследований по времени гибели, комбинация КОЛ+ФК была синергидна, обладала быстрым бактерицидным действием, в т.ч. в отношении устойчивых к КОЛ штаммов. Это первое сообщение о новом применении комбинации КОЛ+ФК при лечении MDRAB инфек-

ций. Комбинация была эффективна при низких терапевтических концентрациях, что ограничивало токсичность. В последующих исследованиях будет определён механизм взаимодействия антибиотиков и пригодность комбинации КОЛ+ФК в качестве нестандартной терапии инфекций, обусловленных грамотрицательными возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью.

* Antimicrobial Research Group, Centre for Immunology and Infectious Disease, Blizard Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, United Kingdom.

**КОМБИНАЦИИ С ДАПТОМИЦИНОМ
КАК АЛЬТЕРНАТИВА ТЕРАПИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ
ИНОРОДНОГО ТЕЛА, ОБУСЛОВЛЕННОЙ
МЕТИЦИЛЛИНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

**DAPTOMYCIN COMBINATIONS AS ALTERNATIVE
THERAPIES IN EXPERIMENTAL FOREIGN-BODY
INFECTION CAUSED BY METICILLIN-SUSCEPTIBLE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS / C. EL HAJ*, O. MURILLO,
A. RIBERA, M. VIVAS, D. GARCIA-SOMOZA, F. TUBAU,
C. CABELLOS, J. CABO, J. ARIZA // INTERNATIONAL
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, AUGUST 2015;
46: ISSUE 2: PAGES 189—195.**

До настоящего времени комбинация левофлоксацина (ЛВФ) с рифампицином (РИФ) считается оптимальной при лечении инфекции протезированного сустава, вызванной чувствительным к метициллину *Staphylococcus aureus* (MSSA), но точной оценки терапевтических альтернатив нет. Основываясь на высокой эффективности комбинации даптомицина (ДАП) и РИФ в отношении метициллиноустойчивого *S. aureus* (MRSA) при указанной инфекции, проверили эффективность комбинаций ДАП+РИФ и ДАП+ЛВФ в качестве альтернативы при лечении модельной инфекции тканевой полости (ИТП), вызванной штаммом MSSA. В течение 7 дней самцы крыс Вистар получали ЛВФ, ДАП, РИФ или комбинации ЛВФ+РИФ, ДАП+РИФ, ДАП+ЛВФ. Эффективность антибиотиков оценивали по количеству бактериальных клеток в жидкости тканевой полости, а степень излечения — по числу адгезированных клеток. Оценивали также устойчивость возбудителя. Монотерапия была менее эффективна, чем комбинированная терапия ($p < 0,05$), при этом наблюдалось появление устойчивости к ДАП и РИФ. Самой высокой эффективностью обладала комбинация

ДАП+РИФ: снижение числа клеток бактерий в жидкости тканевой полости на 4, 9 log КОЕ/мл; показатель излечения, 92% ($p < 0,05$). Различий между комбинациями ЛВФ+РИФ ($-3,4$ log КОЕ/мл; 11%) и ДАП+ЛВФ ($-3,3$ log КОЕ/мл; 47%) не было. При комбинированной терапии появление устойчивых штаммов не наблюдалось. В заключение можно отметить хорошую эффективность комбинаций ДАП+РИФ и ДАП+ЛВФ, а также их способность предотвращать развитие устойчивости. Комбинация ДАП+РИФ обеспечивала более высокую эффективность, чем ЛВФ+РИФ. Комбинации с ДАП были эффективной альтернативой при лечении MSSA инфекции инородного тела. Дальнейшие исследования должны подтвердить вывод о возможной полезности комбинации ДАП+РИФ в качестве препарата выбора при лечении инфекции протезированного сустава, вызванной MSSA.

**АВИБАКТАМ И УСТОЙЧИВОСТЬ SHV
БЕТА-ЛАКТАМАЗ К ИНГИБИТОРАМ.**

**AVIBACTAM AND INHIBITOR-RESISTANT SHV
β-LACTAMASES / M. L. WINKLER,
K. M. PAPP-WALLACE, M. A. TARACILA,
R. A. BONOMO* // ANTIMICROB. AGENTS
CHEMOTHER. JULY 2015; 59: 7: 3700—3709**

Бета-лактамазы (EC 3.5.2.6) представляют значительную угрозу для дальнейшего использования бета-лактамных антибиотиков. Авибактам, новый, не беталактамной природы ингибитор бета-лактамаз, активный в отношении многих бета-лактамаз классов A и C и некоторых вариантов класса D, в настоящее время применяется в клинике в паре с цефтазидимом. Исследовали активность авибактама в отношении различных охарактеризованных изогенных лабораторных вариантов SHV (M69I/L/V, S130G, K234R, R244S и N276D), устойчивых к ингибиторам бета-лактамаз. Было установлено, что S130G, вариант SHV-1, согласно микробиологическим и биохимическим данным, обладал самой высокой устойчивостью к авибактаму. При постоянной концентрации 4 мг/л авибактама как ингибитора бета-лактамаз в комбинации с ампициллином значение МПК с 1 мг/л у штамма, продуцирующего *bla*_{SHV-1}, увеличивалась до 256 мг/л у штамма *Escherichia coli* DH10B, экспрессирующего *bla*_{SHV-S130G}. В стационарной стадии значение k_2/K для варианта S130G при инактивации авибактамом было равно $1,3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ против $60300 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ для SHV-1 бета-лактамазы. Для подавления SHV S130G за определённый отрезок времени требовалась концентрация авибактама в 1700 раз выше концентрации, ингибирующей SHV-1. На основе молекулярного

моделирования было предположено, что от положения аминокислот в активном центре SHV зависит тот или другой путь инактивации в результате образования комплекса с авибактамом, сравнимый со структурой комплекса СТХ-М-15-авибактам, и что в ацилировании авибактама роль основного источника кислоты/основания играет S130. Кроме того, S130 может играть роль при рециклизации. И, как результат, отсутствие гидроксильной группы в положении-130 у S130G варианта значительно замедляет карбамоилирование бета-лактамазы авибактамом за счёт 1)удаления протонного акцептора и донора при катализе, 2) снижения числа водородных связей. Рециклизация, кроме того, вероятнее всего замедляется из-за недостатка общей основы для начала процесса. Результаты рассмотрения других механизмов устойчивости бета-лактамаз класса А к ингибиторам свидетельствуют, что S130 может быть самой важной аминокислотой при подавлении бета-лактамаз класса А, возможно, даже ингибиторами новейшего диазабициклооктанового класса.

* Department of Molecular Biology and Microbiology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.

IN VITRO АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ АЗТРЕОНАМ+АВИБАКТАМ В ОТНОШЕНИИ ГЛОБАЛЬНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2012 И 2013 ГГ.

IN VITRO ACTIVITY OF AZTREONAM-AVIBACTAM AGAINST A GLOBAL COLLECTION OF GRAM-NEGATIVE PATHOGENS FROM 2012 AND 2013 / D. J. BIEDENBACH*, K. KAZMIERCZAK, S. K. BOUCHILLON, D. F. SAHM, P. A. BRADFORD // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JULY 2015; 59: 7: 4239—4248.

Комбинация азтреонам+авибактам разработана для применения при инфекциях, вызванных штаммами Enterobacteriaceae, продуцирующими металло- бета-лактамазу, а также сериновые бета-лактамазы. Была определена активность комбинации азтреонам-авибактам и антибиотиков сравнения методом микроразведений (методология CLSI) в отношении клинических штаммов Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, выделенных в 2012 и 2013 гг. Всего из 190 медицинских центров 39 стран было получено 28501 не повторяющийся клинический штамм. Значения МПК₉₀ азтреонама и азтреонам-авибактама в отношении всех штаммов Enterobacteriaceae ($n=23516$) были равны 64 и 0,12 мкг/мл соответственно, причём подавление 76,2% штаммов происходило при ≤ 4 мкг/мл азтреонама

(пограничное значение CLSI), а при фиксированной концентрации авибактама, равной 4 мкг/мл, и концентрации азтреонам-авибактам ≤ 4 мкг/мл подавление составляло 99,9%. МС₉₀ как азтреонама, так и азтреонам-авибактама в отношении штаммов *P.aeruginosa* ($n=3766$) составила 32 мкг/мл. В отношении штаммов *A.baumannii* ни азтреонам, ни его комбинация с авибактамом не проявили *in vitro* активности. Гены бета-лактамаз 5076 штаммов были охарактеризованы методами ПЦР и секвенирования. Азтреонам не был активен в отношении большинства штаммов Enterobacteriaceae, продуцирующих ферменты класса А и С, а также при сочетании их с металло-бета-лактамазами класса В. И, наоборот, азтреонам (≤ 4 мкг/мл) в комбинации с авибактамом подавлял $>99\%$ штаммов Enterobacteriaceae, продуцентов бета-лактамаз Ambler класса, в т. ч. IMP-, VIM-, NDM металло-бета-лактамаз в сочетании с многими сериновыми бета-лактамазами.

*International Health Management Associates, Inc., Schaumburg, Illinois, USA.

ВАРИАНТЫ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ КРС-2, УСТОЙЧИВЫЕ К ИНГИБИТОРНОМУ ДЕЙСТВИЮ АВИБАКТАМА.

VARIANTS OF β -LACTAMASE KPC-2 THAT ARE RESISTANT TO INHIBITION BY AVIBACTAM / K. M. PAPP-WALLACE, M. L. WINKLER, M. A. TARACILA, R. A. BONOMO* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JULY 2015; 59: 7: 3710—3717.

КРС-2 — самая широко распространённая карбапенемаза класса А, которая гидролизует такие ингибиторы бета-лактамаз, как клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам. Замещения аминокислоты в положении R220 молекулы бета-лактамазы КРС-2 повышает её устойчивость к клавулановой кислоте. Ранее было показано, что авибактам, новый, не бета-лактаманной природы диазабициклооктановый (ДБО) ингибитор бета-лактамаз инактивирует КРС-2. Для лучшего понимания механизма подавления КРС-2 авибактамом была проверена активность комбинаций ампициллин-авибактам и цефтазидим-авибактам в отношении сконструированных вариантов КРС-2 с одиночными замещениями аминокислот в ответственных сайтах (т.е., в Ambler положениях 69, 130, 234, 220 и 276) и, как ранее сообщалось, обеспечивающих устойчивость TEM и SHV бета-лактамаз к ингибитору. Выполнено также тестирование чувствительности, биохимические определения и молекулярное моделирование. Было показано, что возрастающие значения МПК у штаммов *Escherichia coli* DH10B, несущих бета-лактамазы вариантов КРС-2 с замещениями

в положениях S130G, K234R и R220M, наблюдались только в случае комбинаций ампициллин-авибактам (512, 64 и 32 мг/л соответственно против значений МПК для дикого штамма КРС-2, равных от 2 до 8 мл/л). Кинетика стационарной стадии показала, что вариант S130G устойчив к инактивации авибактамом; отношение k_2/K было существенно ниже $4 \log$ этого отношения у фермента дикого штамма ($21580 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1,2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Имитация молекулярной модели и молекулярной динамики даёт основание полагать, что подвижность K73 и его способность активировать S70 (функция главного основания) может быть нарушена в S130G варианте КРС-2, чем и объясняется замедленное ацилирование. Была также выдвинута идея о том, что протонирование сульфата азота авибактама может быть замедлено у S130G варианта, т. к. S130 предположительно является донором протонов, и другие радикалы, возможно K234, должны его компенсировать. Полученные результаты продемонстрировали важную роль радикалов S130, K234 и R220 в механизме инактивации авибактама КРС-2. К счастью, появление S130, K234 и R220 вариантов КРС в клинике не является следствием несостоятельности комбинации цефтазидим-авибактам, поскольку цефтазидим как составляющая комбинации высокоактивен в отношении штаммов *E.coli* DH10B, несущих указанные варианты замещений.

* Department of Molecular Biology and Microbiology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ЦЕФТАРОЛИН-АВИБАКТАМА НА НОРМАЛЬНУЮ КИШЕЧНУЮ МИКРОБИОТУ ЧЕЛОВЕКА.

ECOLOGICAL EFFECT OF CEFTAROLINE-AVIBACTAM ON THE NORMAL HUMAN INTESTINAL MICROBIOTA/M.-UR RASHID, S. ROSENBORG, G. PANAGIOTIDIS, K. SÖDERBERG-LÖFDAL, A. WEINTRAUB, C. E. NORD* //ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2015; 59: 8: 4504—4509.

Цефтаролин+авибактам (ЦФР-АВБ) — новая комбинация антибиотика цефтаролина и также нового ингибитора бета-лактамаз не бета-лактамой природы — авибактама. Целью исследования было изучить влияние комбинации на нормальную кишечную микробиоту человека. Волонтерам ($n=14$) с 1 по 6 день в/в вводили ЦФР-АВБ (600 мг ЦФР фосамила + 600 мг АВБ) каждые 8 ч в виде 2-часовой инфузии, и одну дозу на 7-й день. Пробы фекалий отбирали, начиная за день до первой инфузии (-1), а затем на 2, 5, 7, 9, 14 и 21 день. Число

Escherichia coli снижалось в процессе исследования и нормализовалось на 21 день. Число бактерий *Klebsiella* увеличивалось к 14 суткам и нормализовалось на 21 день. Количество других энтеробактерий в течение исследования снижалось, энтерококков — снижалось со 2 по 7 день, а на 9 день возвращалось к норме. Число *Candida* увеличивалось с 5 по 9 день, нормализовалось после 14 дня. Сниженное число лактобактерий за время исследования восстанавливалось на 14 день, а количество бифидобактерий снижалось на 2 день и нормализовалось на 21 день. Количество *Bacteroides* бактерий не изменялось. Число *Clostridium difficile* уменьшалось на 7 и 9 день, а на 14 и 21 день повышалось. Токсикогенный штамм *C.difficile* был обнаружен у одного волонтера без проявления побочных явлений. Концентрации ЦФР и АВБ в пробах плазмы, взятых на — 1, 2, 5 и 7 день, составили соответственно 0—34,4 и 0—61,6 мг/л, и в пробах фекалий 0—35,5 и 0—98,5 мг/кг. Исследование зарегистрировано в базе данных Европейских клинических испытаний под номером EudraCT 2012 004921-25.

*Department of Laboratory Medicine, Karolinska University Hospital, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

АКТИВНОСТЬ МЕРОПЕНЕМА В КОМБИНАЦИИ С НОВЫМ ИНГИБИТОРОМ БЕТА-ЛАКТАМАЗ RPX7009 В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ Г. НЬЮ ЙОРКА.

ACTIVITY OF MEROPENEM COMBINED WITH RPX7009, A NOVEL β -LACTAMASE INHIBITOR, AGAINST GRAM-NEGATIVE CLINICAL ISOLATES IN NEW YORK CITY /A. LAPUEBLA, M. ABDALLAH, O. OLAFISOYE, C. CORTES, C. URBAN, J. QUALE, D. LANDMAN* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2015; 59: 8: 4856—4860.

Штаммы энтеробактерий с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) и продуцирующие карбапенемазу *Klebsiella pneumoniae* (КРС) являются эндемиками в больницах Нью-Йорка и других регионов. Проверяли активность комбинации меропенема и RPX7009, нового ингибитора бета-лактамаз, в отношении 4500 свежевыделенных в 11 больницах Нью-Йорка клинических штаммов грамотрицательных бактерий. Комбинация показала исключительную *in vitro* активность в отношении *Escherichia coli*, *K.pneumoniae* и *Enterobacter* spp., включая MDR продуценты КРС. Комбинация меропенем (≤ 1 мкг/мл) + RPX7009 (8 мкг/мл) подавляла в целом 131/133 (98,5%) КРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий. Только в отношении ограниченного

числа КРС-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* с уменьшенной экспрессией *ompK35* и *ompK36*, комбинация была малоактивна. Добавление RPX7009 не оказывало влияния на активность меропенема в отношении *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Комбинация меропенем+ RPX7009 представляется перспективным препаратом против КРС-продуцирующих энтеробактерий и заслуживает дальнейшего изучения. В отношении MDR *A. baumannii* и *P. aeruginosa* требуются иные подходы, поскольку они обладают отличающимися механизмами устойчивости к карбапенемам.

* Division of Infectious Diseases, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, New York, USA.

ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ КРС-ПРОДУЦИРУЮЩИМИ ШТАММАМИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ЧЕРТЫ ТЕРАПИИ И СМЕРТНОСТИ ПО ДАННЫМ МНОГОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.

INFECTIONS CAUSED BY KPC-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: DIFFERENCES IN THERAPY AND MORTALITY IN A MULTICENTRE STUDY / M. TUMBARELLO*, E. M. TRECARCHI, F. G. DE ROSA, M. GIANNELLA, D. R. GIACOBBE, M. BASSETTI, A. R. LOSITO, M. BARTOLETTI, V. DEL BONO, S. CORCIONE, G. MAIURO, S. TEDESCHI, L. CELANI, C. S. CARDELLINO, T. SPANU, A. MARCHESE, S. AMBRETTI, R. CAUDA, C. VISCOLI, P. VIALE, ON BEHALF OF ISGRI-SITA (ITALIAN STUDY GROUP ON RESISTANT INFECTIONS OF THE SOCIETÀ ITALIANA TERAPIA ANTINFETTIVA) // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 7: 2133–2143.

В настоящее время инфекции, вызванные штаммами *Klebsiella pneumoniae* (Кр), продуцирующими карбапенемазу (КРС), представляют серьёзную угрозу. В 5 крупных ведущих итальянских больницах было выполнено 4-летнее (2010–2013) ретроспективное когортное исследование, чтобы оценить исходы инфекций и идентифицировать факторы риска 14-дневной смертности. В группу был включён 661 взрослый больной с инфекцией кровотока (ИК, $n=447$) или не бактериемической инфекцией (нижних дыхательных путей, органов брюшной полости, мочевого тракта и др.), обусловленной штаммами КРС-Кр. Все больные получали в течение ≥ 48 час. (эмпирически и/или не эмпирически), по крайней мере, одно лекарство, к которому возбудитель был чувствителен. Большинство летальных исходов наблюдалось в 2-недельный период с начала вспышки инфекции (14-дневная смертность: 225/661, 34,1%).

Как показал регрессивный логистический анализ независимыми прогностическими факторами 14-дневной смертности были ИК (OR, 2,09; 95% ДИ, 1,34–3,29), случаи септического шока (OR, 2,45; 95% ДИ, 1,47–4,08), неадекватная эмпирическая антимикробная терапия (OR, 1,48; 95% ДИ, 1,01–2,18), хроническая почечная недостаточность (OR, 2,27; 95% ДИ, 1,44–3,58), высокий показатель АРАСНЕ III (OR, 1,05; 95% ДИ, 1,04–1,07) и устойчивые к колистину штаммы (OR, 2,18; 95%, 1,37–3,46). Комбинированная терапия, как минимум из двух препаратов, показавших *in vitro* активность в отношении штамма, ассоциировалась с меньшей смертностью (OR, 0,52; 95% ДИ, 0,35–0,77), особенно у больных с ИК, лёгочными инфекциями или высоким показателем АРАСНЕ III, и/или септическим шоком при вспышке инфекции. Значительно более высокий уровень выживаемости был связан с использованием комбинаций, содержащих меропенем, когда значение МПК меропенема для КРС-Кр штамма было равно ≤ 8 мг/л. КРС-Кр инфекции ассоциируются с высокой смертностью. Терапия двумя или более препаратами, активными в отношении возбудителя, улучшают этот показатель, особенно у тяжелобольных.

*Institute of Infectious Diseases, Catholic University of the Sacred Heart, A. Gemelli Hospital, Roma, Italy.

ПЕПТИДЫ С ПРОТИВОПЛЁНОЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПОВЫШАЮТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРОДУЦИРУЮЩИХ КАРБАПЕНЕРАЗУ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ.

ANTIBIOFILM PEPTIDES INCREASE THE SUSCEPTIBILITY OF CARBAPENEMASE-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES TO β -LACTAM ANTIBIOTICS / S. M. RIBEIRO, C. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, B. BAQUIR, C. FARIA-JUNIOR, O. L. FRANCO*, R. E. W. HANCOCK // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JULY 2015; 59: 7: 3906–3912.

Штаммы *Klebsiella pneumoniae* (Кр) с множественной лекарственной устойчивостью, продуцирующие карбапенемазу (КРС), уже становятся обычными возбудителями инфекций в медицинских центрах. Более того, *Klebsiella* может образовывать многоклеточные плёнки, что приводит к повышенной адаптивной антибиотикоустойчивости. Авторы сообщают об антимикробной и противоплёночной активности синтетических пептидов DJK-5, DJK-6 и 1018 в отношении 5 КРС-Кр штаммов. Концентрации, предотвращающие об-

разование биоплёнки такими клиническими штаммами, были ниже значений МПК для планктонных клеток. Эксперименты с проточной культурой клеток подтвердили противоплёночную активность пептидов в отношении 2-суточных зрелых биоплёнок различных КРС-Кр штаммов, а в некоторых случаях — гибель клеток биоплёнки. Клинически релевантные комбинации DJK-6 и беталактамовых антибиотиков, включая меропенем, предотвращали рост планктона и образование биоплёнки КРС-Кр штаммом 1825971. Пептид DJK-6 не менее чем в 16 раз усиливал способность меропенема ликвидировать образованные биоплёнки данным штаммом. Свойство пептида DJK-6 усиливать активность бета-лактамовых антибиотиков, включая меропенем, представляется многообещающей перспективой лечения инфекций, обусловленных КРС-Кр штаммами.

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil.

IN VIVO ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ОБРАЗУЮЩЕЙ БИОПЛЁНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

IN VIVO EFFICACY OF ANTIMICROBIALS AGAINST BIOFILM-PRODUCING *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / V. PAWAR*, U. KOMOR, N. KASNITZ, P. BIELECKI, M. C. PILS, B. GOCHT, A. MOTER, M. RONDE, S. WEISS, S. HÄUSSLER // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2015; 59: 8: 4974—4981

Больные муковисцидозом (МВ) обычно страдают от хронических инфекций *Pseudomonas aeruginosa*, сопровождающихся образованием биоплёнок, что является главной причиной тяжести заболевания. Было показано, что *P. aeruginosa* способна интенсивно колонизировать твёрдые опухоли у мышей после в/в инъекции и образовывать биоплёнки на ткани опухоли, что было подтверждено электронным микроскопированием. Подобные структуры не наблюдались у транспозонных мутантов, дефектных по признаку плёнокообразования. Сравнение транскрипционных профилей *P. aeruginosa* показало физиологическое сходство бактерий в опухоли мышей и муковисцидозной лёгочной ткани. Это делает возможным испытывать современные антибиотики для лечения МВ лёгких, инфицированных *P. aeruginosa*, как-то ципрофлоксацин, колистин и тобрамицин, на модели опухоли у мышей. Было установлено, что рекомендуемые клинические дозы антибиотиков не способны элиминировать штамм *P. aeruginosa* PA14 дикого типа, но

были эффективны в отношении дефицитных по плёнокообразованию. Однако лечение комбинацией колистина и тобрамицина, взятых в более низких концентрациях, значительно снижало число клеток *P. aeruginosa* PA14 в опухоли. Таким образом, предложена экспериментальная модель, обеспечивающая основу для испытания проверенных и вновь разработанных противоплёночных соединений.

* Molecular Immunology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany.

УСИЛЕНИЕ ПРОТИВОПЛЁНОЧНОЙ АКТИВНОСТИ АМФОТЕРИЦИНА В ИНГИБИТОРАМИ БИОСИНТЕЗА ПОЛИАМИНОВ.

ENHANCEMENT OF THE ANTIBIOFILM ACTIVITY OF AMPHOTERICIN B BY POLYAMINE BIOSYNTHESIS INHIBITORS / Z. LIAO, X. Z. GUAN, Z. Y. ZHU, X. W. YAO, Y. YANG, Y. Y. JIANG, Y. Y. CAO* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, JULY 2015; 46: 1: 45—52.

Задачей исследования было изучить действие ингибиторов синтеза полиаминов на активность амфотерицина В (АмфВ) в отношении биоплёнок *Candida albicans* и выяснить механизмы действия. Противоплёночная активность АмфВ значительно усиливалась при использовании его в комбинации с ингибиторами биосинтеза полиаминов: 1,4-диамино-2-бутанона (ДАБ) и α -дифторометилорнитина (ДФМО). Последующие исследования показали, что ДАБ и ДФМО усиливают также противоплёночную активность некоторых других антимикотиков (каспофунгина, миконазола, нистатина). Кроме того, комбинация АмфВ и ингибиторов биосинтеза полиаминов приводила к увеличению внутриклеточного содержания реактивных форм кислорода. В дополнение к этому, каспазная активность и транскрипция кодирующего каспазу гена *CaMCA1* сильно возрастала при комбинированной терапии АмфВ и ингибиторами биосинтеза полиаминов. Существенно, что биоплёнка, образованная $\Delta camCA1$ мутантом, при комбинированной терапии демонстрировала большую жизнеспособность и более низкую каспазную активность, по сравнению со штаммом дикого типа, что свидетельствовало о важной роли каспазной активности, опосредованной *CaMCA1*, в усилении ингибиторами биосинтеза полиаминов действия АмфВ. Полученные данные содержат полезную информацию для разработки новых стратегий усиления противоплёночной активности антигрибковых препаратов.

Материал подготовлен Н. С. Бондаревой, Москва

