

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 61



7-8'2016

Научно-практический журнал

Сделайте шаг к защите от пневмококковой инфекции



Превенар 13

Вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная

Первая и единственная пневмококковая
конъюгированная вакцина для детей*
и взрослых

* от 2 месяцев

Краткая инструкция по применению лекарственного препарата ПРЕВЕНАР® 13
(вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная)

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА:

сuspension для внутримышечного введения
Вакцина Превенар® 13 представляет собой капсулярные полисахариды 13-ти серотипов пневмококка: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F; индивидуально конъюгированные с дифтерийным белком CRM₁₉₇ и адсорбированные на алюминии фосфате.

ОПИСАНИЕ:

Гомогенная suspension белого цвета.
НАЗНАЧЕНИЕ: Профилактика пневмококковых заболеваний, включая инвазивные инфекции (в том числе менингит, бактериемию, сепсис), пневмонии и средние отиты, вызываемых *Streptococcus pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F с 2-х месяцев жизни.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

- Повышенная чувствительность на предшествующее введение Превенар® 13 или Превенар® (в том числе, анафилактический шок, тяжелые генерализованные аллергические реакции);
- Повышенная чувствительность к дифтерийному анатоксину и/или вспомогательным веществам;
- Острые инфекционные или неинфекционные заболевания, обострения хронических заболеваний. Вакцинацию проводят после выздоровления или в период ремиссии.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ

Способ введения

Вакцину вводят в разовой дозе 0,5 мл внутримышечно. Детям первых лет жизни прививки проводят в верхне-наружную поверхность средней трети бедра, лицам старше 2-х лет – в дельтовидную мышцу плеча.

Перед применением шприц с вакциной Превенар® 13 необходимо хорошо встряхнуть до получения гомогенной suspension. Не использовать, если при осмотре содержимого шприца выявляются инородные частицы, или содержимое выглядит иначе, чем в разделе «Описание» настоящей инструкции.

Не вводить Превенар® 13 внутрисосудисто и внутримышечно в ягодичную область!

Если начата вакцинация Превенар® 13, рекомендуется завершить ее также вакциной Превенар® 13. При вынужденном увеличении интервала между инъекциями любого из приведенных выше курсов вакцинации, введение дополнительных доз Превенар® 13 не требуется.

Схема вакцинации

Возраст начала вакцинации	Схема вакцинации	Интервалы и дозировка
2 мес-6 мес	3+1 или 2+1	Индивидуальная иммунизация: 3 дозы с интервалом не менее 4 нед между введениями. Первую дозу можно вводить с 2-х мес. Ревакцинация однократно в 11-15 мес. Массовая иммунизация детей: 2 дозы с интервалом не менее 8 нед между введениями. Ревакцинация однократно в 11-15 мес.
7-11 мес	2+1	2 дозы с интервалом не менее 4 нед между введениями. Ревакцинация однократно на втором году жизни
12-23 мес	1+1	2 дозы с интервалом не менее 8 нед между введениями
2 года и старше	1	Однократно

Дети, ранее вакцинированные Превенар®

Вакцинация против пневмококковой инфекции, начатая 7-валентной вакциной Превенар®, может быть продолжена Превенар® 13 на любом этапе схемы иммунизации.

Лица в возрасте 18 лет и старше

Необходимость ревакцинации Превенар® 13 не установлена. Решение об интервале между введением вакцин Превенар® 13 и ППВ23 следует принимать в соответствии с официальными методическими рекомендациями.

Особые группы пациентов

У пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток рекомендуется серия иммунизации, состоящая из 4 доз препарата Превенар® 13 по 0,5 мл. Первая серия иммунизации состоит из введения трех доз препарата: первая доза вводится с третьего по шестой месяц после трансплантации. Интервал между введениями должен составлять 1 месяц. Ревакцинирующую дозу рекомендуется вводить через 6 месяцев после введения третьей дозы.

Недоношенным детям рекомендуется четырехкратная вакцинация. Первая серия иммунизации состоит из 3-х доз. Первую дозу следует вводить в возрасте 2 месяца независимо от массы тела ребенка с интервалом 1 месяц между дозами. Введение четвертой (бустерной) дозы рекомендуется в возрасте 12-15 месяцев.

Пожилые пациенты

Иммуногенность и безопасность вакцины Превенар® 13 были подтверждены для пожилых пациентов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

При температуре от 2 до 8° С. Не замораживать. Хранить в недоступном для детей месте.

СРОК ГОДНОСТИ

3 года. Не использовать после истечения срока годности, указанного на упаковке.

Петензии потребителей направлять по адресу:

- Представительство корпорации Пфайзер Эйч. Си. Пи. Корпорэйшн, 123317 Москва, Пресненская наб., д. 10, БЦ «Башня на Набережной» (Блок С)
Тел.: (495) 287-5000, факс: (495) 287-5300
- ООО «НПО Петровакс Фарм», Российская Федерация, 142143, Московская область, Подольский район, с. Покров, ул. Сосновая, д. 1
Тел./факс: (495) 926-2107, e-mail: info@petrovax.ru
- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор): 109074, Москва, Славянская пл., д. 4, стр. 1
Тел.: (495) 698-4538; (499) 578-0230

На правах рекламы
WRUPRAM015025

ООО «Пфайзер Инновации», Россия, 123317, Москва, Пресненская наб., д. 10, БЦ «Башня на Набережной» (Блок С)
Тел.: +7 (495) 287 50 00. Факс: +7 (495) 287 53 00.



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

А. 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 2016

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 2016

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 61

7—8'2016

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. Климко Н. Н.

Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.

Проф., д. м. н. Никитин А. В.

Проф., д. б. н. Полин А. Н.

Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.

Проф. Руднов В. А.

Проф. Тишков В. Н.

Проф., д. б. н. Фирсов А. А.

Проф., д. м. н. Яковлев С. В.

Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.

к.б.н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.

Бибикова М. В.

Васильев А. Н.

Волжанин В. М.

Дмитриева Н. В.

Долгова Г. В.

Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.

Ильина Е. Н.

Клясова Г. А.

Ленёва И. А.

Митрохин С. Д.

Романцов М. Г.

Сычев Д. А.

Тец В. В.

Цыбанев А. А.

Ших Е. В.

**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

Бибикова М. В., Спиридонова И. А., Даниленко А. Н.,
Ким Ю. А., Корыстова А. Ф., Шапошникова В. В.,
Корыстов Ю. Н.
Скрининг продуцентов ингибиторов
15-липоксигеназы среди микромицетов
Кузнецова Т. А., Смолина Т. П., Беседнова Н. Н.,
Сильченко А. С., Имбс Т. И., Ермакова С. П.
Влияние сульфатированных полисахаридов из бурой
водоросли *Fucus evanescens* и продукта их ферментативной
трансформации на функциональную активность клеток
врожденного иммунитета
Островский К. П., Переверзева Э. Р., Трещалин И. Д.,
Осипова Н. С., Трещалин М. И., Возняковская Е. В.,
Балабаньян В. Ю., Максименко О. О., Гельперина С. Э.
Токсикологическое исследование внутривенной
формы рифапентина

В помощь практикующему врачу

Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Алябьева Н. М.,
Тепяев Р. Ф., Карасева О. В., Чеботарь И. В., Маянский Н. А.
Устойчивость к антибиотикам и молекулярные механизмы
резистентности у карбапенем-нечувствительных изолятов
Klebsiella pneumoniae, выделенных в педиатрических ОРИТ
г. Москвы
Сычева М. В., Карташова О. Л.,
Щепитова Н. Е., Сафронов Ал. А.
Антибиотикорезистентность бактерий рода *Enterococcus*,
выделенных из организма человека в норме
и при патологии

Обзоры

Виноградова К. А., Булгакова В. Г., Полин А. Н.
Стрептомицеты в свете концепции «многоклеточности»
бактерий
Гучев И. А.
Вакцинопрофилактика пневмококковых инфекций
нижних дыхательных путей у взрослых
без иммуносупрессии

Original Papers

- 3 Bibikova M. V., Spiridonova I. A., Danilenko A. N.,
Kim Yu. A., Korystova A. F., Shaposhnikova V. V.,
Korystov Yu. N.
Screening of Organisms Producing Inhibitors
of 15-Lipoxygenase Among Micromycetes
- 10 Kuznetsova T. A., Smolina T. P., Besednova N. N.,
Silchenko A. S., Imbs T. I., Ermakova S. P.
Effect of Sulfated Polysaccharides from Brown Alga
Fucus evanescens and Their Enzymatic Transformation
Product on Functional Activity of Innate
Immunity Cells
- 15 Ostrovskiy K. P., Pereverzeva E. R., Treshchalin I. D.,
Osipova N. S., Treshchalin M. I., Voznyakovskaya E. V.,
Balabanyan V. Yu., Maksimenko O. O., Gelperina S. E.
Toxicological Evaluation of Intravenous Formulation
of Rifapentine

Guidelines for Practitioners

- 22 Kryzhanovskaya O. A., Lazareva A. V., Alyabieva N. M.,
Tepaev R. F., Karaseva O. V., Chebotar I. V., Mayanskiy N. A.
Antibiotic Resistance and Its Molecular Mechanisms
in Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae*
Isolated in Pediatric ICUs in Moscow
- 27 Sycheva M. V., Kartashova O. L.,
Shchepitova N. E., Safronov Al. A.
Antibiotic Resistance of Enterococci Isolated
from Healthy Humans and Patients
with Various Pathologies

Reviews

- 33 Vinogradova K. A., Bulgakova V. G., Polin A. N.
Streptomycetes in the Light of the Concept
of Multicellularity of Bacteria
- 48 Guchev I. A.
Vaccinal Prevention of Lower Respiratory Tract
Pneumococcal Disease in Adults Without
Immunosuppression

По страницам журналов 58 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.

Скрининг продуцентов ингибиторов 15-липоксигеназы среди микромицетов

М. В. БИБИКОВА¹, И. А. СПИРИДОНОВА¹, А. Н. ДАНИЛЕНКО², Ю. А. КИМ³,
А. Ф. КОРЫСТОВА⁴, В. В. ШАПОШНИКОВА⁴, Ю. Н. КОРЫСТОВ⁴

¹ ООО «ВИОРИН», Москва

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН, Москва

³ Институт биофизики клетки РАН, Московская обл., Пущино

⁴ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пущино

Screening of Organisms Producing Inhibitors of 15-Lipoxygenase Among Micromycetes

M. V. BIBIKOVA¹, I. A. SPIRIDONOVA¹, A. N. DANILENKO², YU. A. KIM³,
A. F. KORYSTOVA⁴, V. V. SHAPOSHNIKOVA⁴, YU. N. KORYSTOV⁴

¹ Viorin, Moscow

² N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

³ Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

⁴ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

Исследовали влияние экстрактов, выделенных из мицелия грибов *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria fellina* №7 и *Beauveria bassiana* №15 на активность 15-липоксигеназы (15-ЛО), выделенной из ретикулоцитов крыс. Активность 15-ЛО определяли по окислению линолевой кислоты. Показано, что экстракт из мицелиальной массы комплекса грибов ингибирует 15-ЛО ($IC_{50}=12$ мкг/мл). Ингибирующая 15-ЛО активность комплексного экстракта обусловлена веществами, экстрагируемыми из *Lecanicillium lecanii* №169. Были определены фракции экстракта, ответственные за его активность и идентифицированы соединения, содержащиеся в этих фракциях. Ими оказались во фракции 10 — 4-гидроксibenзойная кислота и 4-гидроксibenзиловый спирт, во фракции 11 — флавоноид генистеин. Рассмотрена возможная роль ингибирования этими соединениями 15-ЛО в антиатеросклеротической активности экстракта грибов.

Ключевые слова: ингибиторы 15-липоксигеназы, микромицеты, 4-гидроксibenзойная кислота, генистеин.

The effects of extracts from the mycelium of *Lecanicillium lecanii* No.169, *Beauveria fellina* No.7 and *Beauveria bassiana* No.15 on the activity of 15-lipoxygenase (15-LO) recovered from rat reticulocytes was investigated. The activity of 15-LO was determined by oxidation of linolic acid. The extract from the mycelium of the fungal complex was shown to inhibit 15-LO (IC_{50} of 12 mcg/ml). The inhibitory effect of the combined extract on 15-LO was due to the substances recovered from *Lecanicillium lecanii* No.169. The extract fractions responsible for the activity were determined and the compounds containing the fractions were identified. They proved to be 10 — 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzyl alcohol and genistein, a flavonoid from fraction 11. The possible role of the inhibitory effect of the compounds on 15-LO in the antiatherosclerotic activity of the fungal extract is discussed.

Key words: 15-lipoxygenase inhibitors, micromycetes, 4-hydrobenzoic acid, genestein.

Введение

Ранее было установлено, что многие инсектицидные грибы продуцируют соединения с высокой гиполипидемической, кардиотонической, иммуносупрессивной и другими активностями. При проведении поиска продуцентов соединений с гиполипидемической активностью нами были отобраны штаммы *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria fellina* №7, *Beauveria bassiana* №15. Активность проявляли препараты, выделенные из мицелия комплекса этих грибов. Пре-

парат при введении *per os* кроликам с искусственной гиперлипидемией в низких дозах значительно снижали уровень холестерина в крови животных, а также снижали отношение липопротеидов низкой (ЛПНП) и высокой плотности [1]. Наибольшая активность была установлена у штамма *Lecanicillium lecanii* №169. Экстракт мицелия этого гриба при дозе в 100 раз меньшей, чем ловастатин (клинический гиполипидемический препарат), значительно и более пролонгировано снижал уровень холестерина в крови кроликов с искусственной гиперлипидемией [2], а также проявлял высокую антиоксидантную активность [3]. Было также отмечено, что линолевая кислота, исходно содержащаяся в экстракте, не окисля-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а. ООО «Виорин»

лась, что позволило предположить наличие в экстракте ингибитора окисления полиненасыщенных жирных кислот.

Подавление окисления ненасыщенных жирных кислот комплексными препаратами из отобранных нами микромицетов может иметь отношение к их антиатеросклеротическому действию. Существует положительная корреляция между окислением ЛПНП и риском сердечно-сосудистых заболеваний [4]. Известно, что количество перекисных продуктов в ЛПНП больных атеросклерозом больше, чем в ЛПНП здоровых [5]. Гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот биологически активны и передают приобретённую активность целой частице ЛПНП. К этой активности относится стимуляция экспрессии адгезивных молекул, колониестимулирующего фактора, моноцитарного хемоаттрактантного белка и др. факторов [6]. Кроме того, перекисно-модифицированные ЛПНП активно захватываются макрофагами [7]. В образовании модифицированных ЛПНП могут участвовать липоксигеназы. В частности, было показано, что 15-липоксигеназа (15-ЛО) ускоряет перекисную модификацию ЛПНП *in vitro* [8]. Показано увеличение экспрессии этого фермента в жировых полосках и атеросклеротических бляшках кролика и человека [9]. У трансгенных мышей со сверхэкспрессией 15-ЛО в сосудах атеросклеротические повреждения аорты были значительно более выражены [10].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния комплексных экстрактов грибов *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria fellina* №7 и *Beauveria bassiana* №15 на активность 15-липоксигеназы, а также идентификация активных соединений экстрактов.

Материал и методы

Культуры микромицетов выращивали и хранили на агаризованной среде Райстрика. Для оценки биологической активности культуры растили в условиях глубинного культивирования в колбах на 750 мл со 150 мл питательной среды А-9 с круговым вращением 180 об/мин в течение 14 сут. Биомассу микроорганизмов отделяли центрифугированием. Мицелий каждой культуры дважды экстрагировали 5 объемами ацетона в течение 30 мин. Ацетоновые экстракты объединяли и удаляли растворитель до водного остатка. Водный остаток встряхивали в делительной воронке с равным объемом хлороформа и отделяли реэкстракт в хлороформе от водной фазы. Растворитель удаляли на вакуум-выпарной установке (ИР-1) при 45°C.

Методом колоночной хроматографии было проведено разделение экстракта гриба *Lecanicillium lecanii* №169 на отдельные фракции. Размер колонки 1,5:30 (диаметр 1,5 см, высота 30 см). В колонку, заполненную Kieselgel 60 (фирмы Merck) в петролейном эфире вносили препараты — сыrcы, растворенные в системе растворителей петролейный эфир—ацетон 4:1. Элюцию фракций с колонки проводили системой растворителей петролейный эфир:ацетон (50:1). Фракции очищали методом ВЭЖХ. Степень очистки была не менее 98%.

Физико-химические характеристики компонентов фракций 10 и 11 и их масс-спектры определяли с помощью методов

2D ЯМР(COSY, HSQC, HMBC). Подтверждением правильности установленных структур являлось совпадение рассчитанных и экспериментальных спектров ЯМР.

15-липоксигеназу (15-ЛО) получали из ретикулоцитов, содержащих большое её количество [11]. В норме в крови ретикулоцитов мало (1,5—2%), их количество возрастает при кровопотерях или лизисе эритроцитов. Для увеличения доли ретикулоцитов в крови крысам вводили фенилгидразин (Sigma, USA), 50 мкг/г, лизирующий эритроциты [12]. Количество ретикулоцитов в крови определяли на препаратах, фиксированных метанолом и окрашенных по Гимзе. Подсчитывали 2000 клеток на препарат. Количество ретикулоцитов в крови достигало максимума через 5 сут после введения фенилгидразина. Величина максимума на разных крысах варьировала от 30 до 60% от всех клеток крови. В этот срок производили забор крови из сердца, клетки осаждали центрифугированием при 700 g, дважды отмывали в растворе Хэнкса pH 7,4 и лизировали на льду в течение 15 мин добавлением к осадку дистиллированной воды ($t=2-4^{\circ}\text{C}$). Все дальнейшие процедуры проводили при такой же температуре. Лизат клеток был доведён до pH 6,0 добавлением 0,1 М HCl. Остатки клеток удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин. Белок осаждали высаливанием сульфатом аммония в течение 2 ч, добавляя его в супернатант до 55% насыщения, затем центрифугировали при 10000 g, 20 мин и отделяли белковый осадок. Осадок растворяли в 0,1 М KH_2PO_4 и диализовали против этого же буфера. Гемоглобин используемой концентрацией сульфата аммония практически не высаливался, оставаясь в растворе, т. е. происходило разделение 15-ЛО (осадок) и гемоглобина. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 и 280 нм по формуле $C \text{ (мг/мл)} = (E_{280} \cdot 1,5) - (E_{260} \cdot 0,76)$ [13].

Активность 15-липоксигеназы определяли по модифицированному методу [11]. Метод основан на спектрофотометрическом определении гидроперекисей, образующихся при окислении линолевой кислоты липоксигеназой и имеющих максимум поглощения при $\lambda=234$ нм. Коэффициент экстинкции гидроперекисей равен $25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [14]. Реакционная смесь содержала 0,5 мМ линолевой кислоты (Sigma, США), 0,07% дезоксихолата Na (Диа М, Германия), 5% этанола в 0,1 М калий фосфатном буфере pH 7,4 с конечным объемом 2,0 мл. При быстром перемешивании добавляли белковый раствор, выделенный из ретикулоцитов. Регистрировали увеличение поглощения при 234 нм (A234/мин) на спектрофотометре Perkin-Elmer (M-40) при температуре $2-4^{\circ}\text{C}$ и постоянном перемешивании. Спонтанное окисление линолевой кислоты было пренебрежимо мало за время регистрации. 15-ЛО является ферментом, активируемым продуктом — гидроперекисями [15], поэтому при использовании линолевой кислоты, не содержащей или содержащей мало гидроперекисей, 15-ЛО вначале мало активна — лаг-период, но активность возрастает по мере увеличения гидроперекисей. Скорость достигает максимума через 3—4 мин и увеличение концентрации гидроперекисей становится линейным во времени (рис. 1). Скорость окисления линолевой кислоты 15-ЛО (коэффициент В) определяли в программе Origin по линейному участку кривой увеличения гидроперекисей, описываемому уравнением: $Y=A+BX$, где Y—оптическая плотность, X—время.

Перед исследованием влияния ингибиторов на активность 15-ЛО были определены оптимальные условия измерения активности липоксигеназы. Активность 15-ЛО оказалась максимальной при концентрации дезоксихолата Na 0,07% (рис. 2). Активность 15-ЛО из ретикулоцитов возрастает с увеличением концентрации белка до 60 мкг/мл, а при дальнейшем увеличении концентрации белка активность уменьшается (рис. 3). Такой характер зависимости может быть объяснён тем, что в клетках есть белки восстанавливающие гидроперекиси — каталаза, пероксидазы. При определении влияния ингибиторов на активность 15-ЛО в реакционную смесь добавляли всегда 30 мкг/мл общего белка,

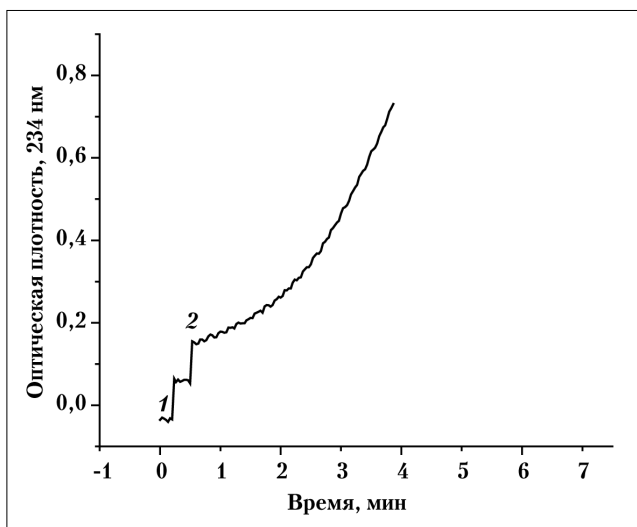


Рис. 1. Кинетика увеличения концентрации гидроперексидов линолевой кислоты в присутствии 15-ЛО, 30 мкг/мл.

1 — добавление белка; 2 — добавление линолевой кислоты. $V=12,6$ мкМ/мин.

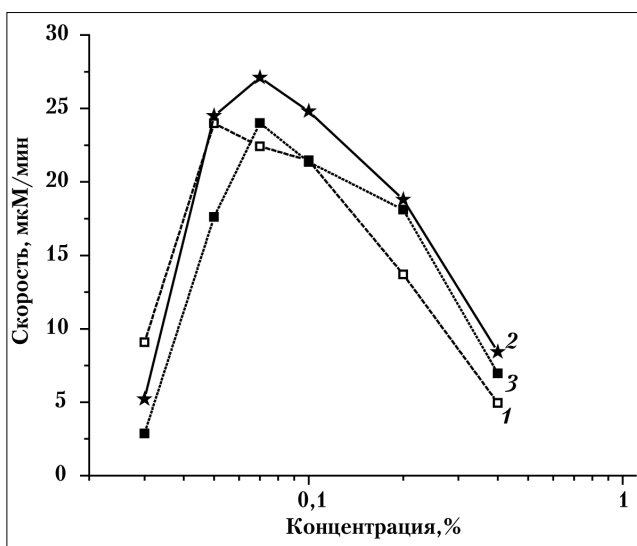


Рис. 2. Зависимость скорости окисления линолевой кислоты в присутствии 30 (1), 60 (2), 80 (3) мкг/мл белка из ретикулоцитов от концентрации дезоксихолата Na.

при этом скорость увеличения концентрации гидроперексидов была в интервале 12—18 мкМ/мин.

Экстракты грибов растворяли в этаноле до концентрации 13 мг/мл и в начале работы из этого матричного раствора готовили водные растворы, концентрация которых была в 100 раз больше конечной — в кювете. При этом была отмечена плохая воспроизводимость результатов. Мы предположили, что компоненты экстрактов плохо растворимы в воде и при водных разведениях налипают на гидрофобных поверхностях пластиковых пробирок и наконечников пипеток. Действительно, было показано, что экстракт комплекса грибов при концентрации 5 мкг/мл подавляет активность 15-ЛО при добавлении в кювету из спиртового раствора, но не действует, если делать промежуточные разведения водным раствором

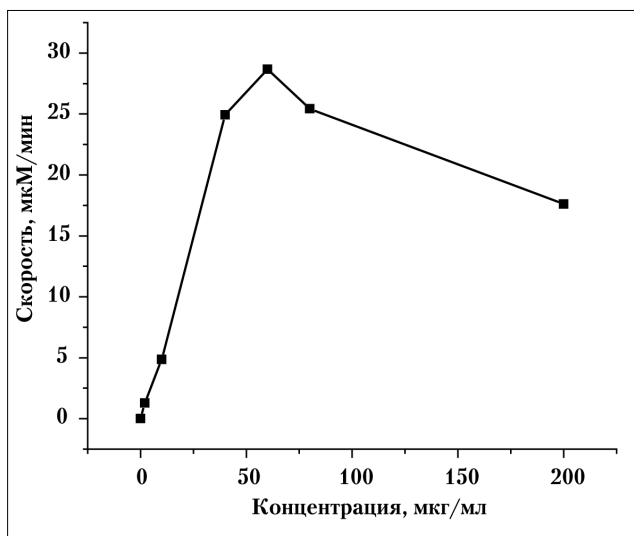


Рис. 3. Зависимость скорости окисления линолевой кислоты от концентрации белка из ретикулоцитов.

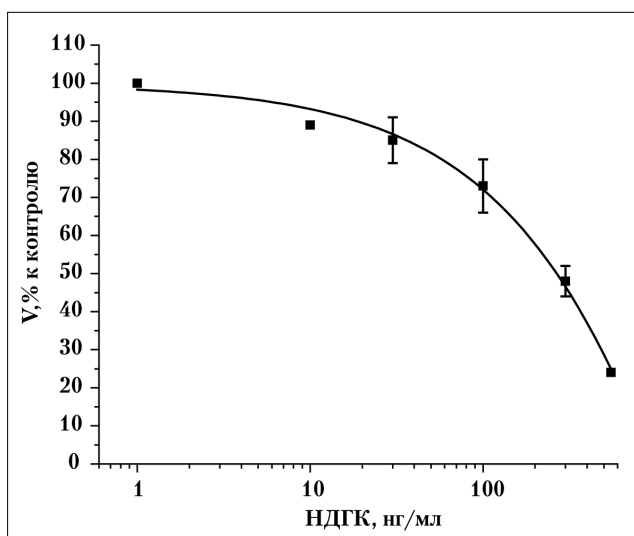


Рис. 4. Влияние НДГК на скорость окисления линолевой кислоты 15-липоксигеназой. $IC_{50}=270$ нг/мл.

(буфером). Поэтому в дальнейшей работе экстракты и их фракции добавляли в кювету только из спиртового раствора. Компоненты экстрактов, кроме того, налипали на стенки кюветы и оставались на стенках при её ополаскивании этанолом. Оставшиеся на стенках кюветы соединения экстрактов переходили в раствор при следующих измерениях, увеличивая лаг-период и уменьшая скорость реакции окисления линолевой кислоты 15-ЛО. Для устранения этого артефакта кювету мыли хромпиком после каждого измерения.

Данные, представленные на рисунках, представляют собой средние значения $\pm$ стандартную ошибку среднего. Статистический анализ был проведен с помощью парного t-теста Стьюдента. Значение $p<0,05$ считалось значимым.

Результаты и обсуждение

Прежде чем исследовать влияние экстрактов грибов на активность 15-ЛО, необходимо было проверить методику на известном ингибиторе липоксигеназ — нордигидрогваяретовой кислоте

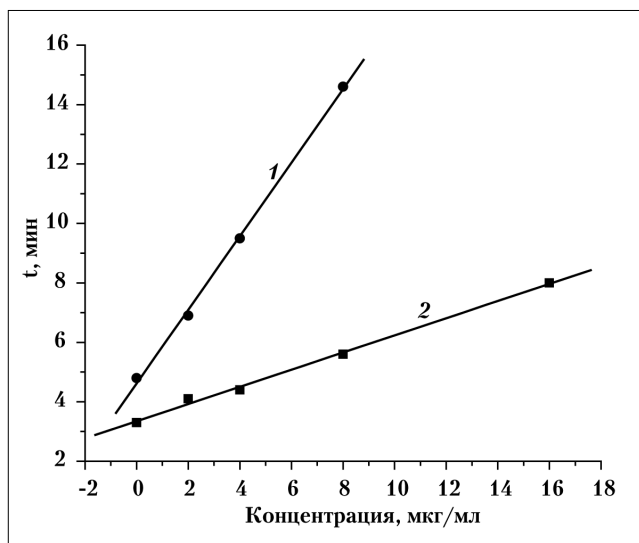


Рис. 5. Влияние экстракта комплекса грибов на лаг-период (t) окисления линолевой кислоты 0,5 (1) и 1 мМ (2) 15-липоксигеназой.

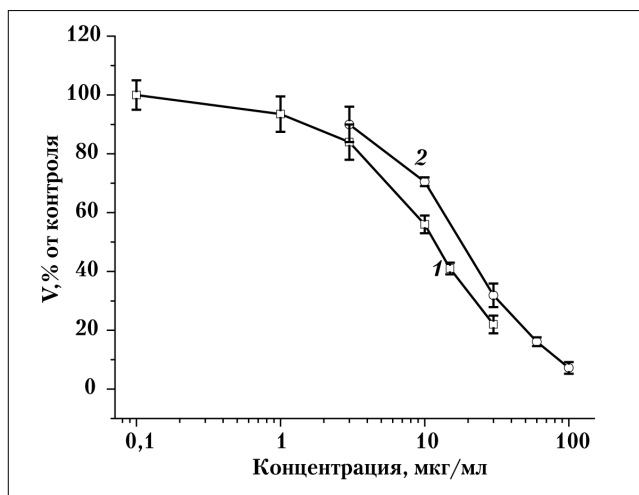


Рис. 6. Влияние экстрактов комплекса грибов (1) и *Lecanicillium lecanii* №169 (2) на скорость окисления линолевой кислоты 15-липоксигеназой. IC_{50} 1 = 12 мкг/мл, IC_{50} 2 = 15 мкг/мл.

(НДГК). Кроме того, определение IC_{50} НДГК необходимо для сравнения её ингибирующей активности с исследуемыми экстрактами. На рис. 4 приведены данные по влиянию НДГК на активность 15-ЛО. При выражении концентрации НДГК в логарифмическом масштабе уменьшение скорости реакции с увеличением концентрации аппроксимируется сигмоидной зависимостью. IC_{50} НДГК, определённое по этой кривой, равно 270 нг/мл.

При добавлении экстракта комплекса грибов в кювету сразу после линолевой кислоты лаг-период реакции окисления линолевой кислоты 15-ЛО увеличивается пропорционально добавленной концентрации (рис. 5). Это указывает на присут-

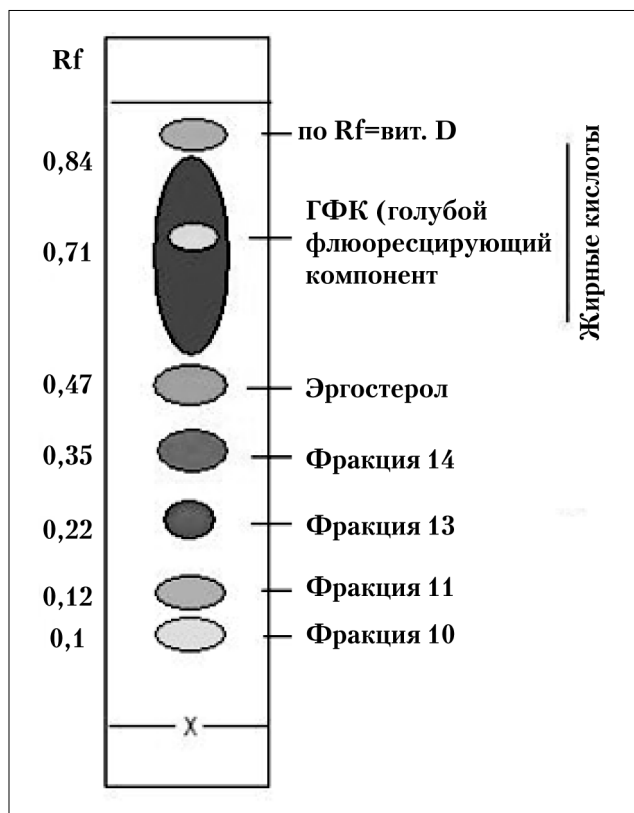


Рис. 7. Схема хроматограммы экстракта *Lecanicillium lecanii* №169.

ствие в экстракте ингибитора 15-ЛО, который тормозит накопление гидроперекисей, активирующих 15-ЛО. Причём ингибитор расходуется в реакции, поскольку, когда кривая накопления гидроперекисей выходит на линейный участок — полная активация 15-ЛО, то скорость реакции, например при концентрации экстракта комплекса, 8 мкг/мл, оказывается почти такой же (96%), как без ингибитора. Для определения влияния экстрактов и их фракций на скорость окисления линолевой кислоты 15-ЛО их добавляли в кювету в момент, когда начинался линейный участок кривой накопления гидроперекисей — при достижении оптической плотности 0,48.

На рис. 6 приведены данные по влиянию экстракта комплекса (кривая 1) на активность 15-ЛО. Видно, что экстракт комплекса содержит ингибитор 15-ЛО. С увеличением концентрации скорость реакции уменьшается, причём характер зависимости такой же, как при действии НДГК. IC_{50} свежеприготовленного экстракта комплекса составляет 12 мкг/мл. Это в 44 раза выше, чем IC_{50} НДГК, что, впрочем, не свидетельствует о низкой эффективности ингибитора 15-ЛО из экстракта, поскольку неизвестно количественное содержание ингибитора в экстракте.

Экстракт комплекса грибов получали из трёх видов: *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria feldina* №7, *Beauveria bassiana* №15. Экстракты грибов

Влияние фракций 10 и 11 на активность 15-ЛО

Вариант	V*, OD/мин	V/V _к , %
Контроль	0,076±0,005	100
Фракция 10, 0,5 мкг/мл	0,045±0,004	59
Фракция 10, 1 мкг/мл	0,043±0,003	56
Фракция 10, 2 мкг/мл	0,031±0,004	41
Фракция 11, 0,5 мкг/мл	0,045±0,003	59
Фракция 11, 1 мкг/мл	0,039±0,003	51
Фракция 11, 2 мкг/мл	0,036±0,002	47

Примечание. * — скорость образования гидроперекисей за вычетом спонтанного окисления линолевой кислоты (0,014 OD/мин).

Beauveria fellina №7 и *Beauveria bassiana* №15 не влияли на активность 15-ЛО в предельно растворимых в воде концентрациях — до 30 мкг/мл. В то время как, ингибирующая активность экстракта *Lecanicillium lecanii* №169 оказалась сравнимой с активностью полного комплекса грибов (рис. 6, кривая 2). IC₅₀ экстракта *Lecanicillium lecanii* №169, определённая по данным рис. 6, равна 15 мкг/мл, что близко к IC₅₀ экстракта комплекса грибов — 12 мкг/мл. Таким образом, ингибирующая 15-ЛО активность экстракта комплекса грибов обусловлена, в основном, компонентами, экстрагируемыми из гриба *Lecanicillium lecanii* №169.

Методом колоночной хроматографии было обнаружено наличие большого количества компонентов в экстракте *Lecanicillium lecanii* №169 (рис. 7): фракция с величиной R_f, сходной с витамином Д, содержит голубой флуоресцирующий компонент, большое количество жирных кислот, эргостерол, фракции, обозначенные 10 и 11, а также фракции 14 и 13, последняя проявляется после обработки хроматограммы парами йода. Флуоресцирующий компонент и эргостерол были не активны в максимально растворимых концентрациях (до 30 мкг/мл), а экстракт без 10- и 11-й фракций оказался мало активен в ингибировании 15-ЛО: IC₅₀=195 мкг/мл, что в 16 раз больше IC₅₀ цельного экстракта. Фракции 10 и 11 оказали ингибирующее действие на липоксигеназу при гораздо меньших концентрациях, чем цельный экстракт (табл. 1). Представленные в табл. 1 данные показывают, что обе фракции ингибируют 15-ЛО на 50% при концентрациях 1–2 мкг/мл. Фракции 10 и 11 почти на порядок эффективнее цельного экстракта, что указывает на обусловленность ингибирующей 15-ЛО активности экстракта соединениями, содержащимися в этих фракциях. Эти соединения были идентифицированы. Фракции были наработаны методом препаративной ВЭЖХ. С помощью методов 2D ЯМР(COSY, HSQC, HMBSC) были определены физико-химические характеристики компонентов и их масс-спектры. Подтверждением правильности установленных структур являлось совпадение рассчитанных и экспериментальных спектров ЯМР¹³С. Структуры компонентов приведены на рис. 8.

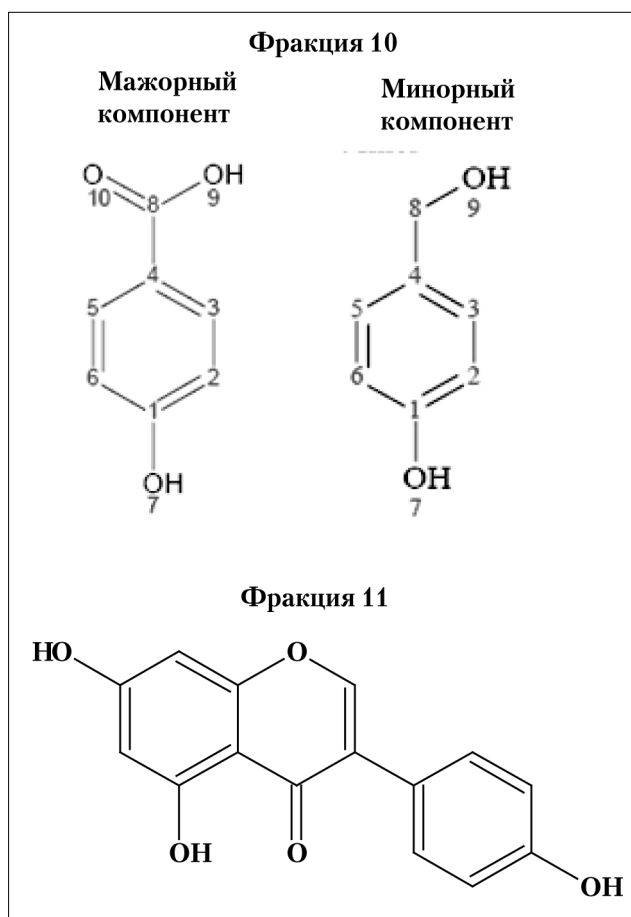


Рис. 8. Формулы компонентов фракций 10 и 11 экстракта *Lecanicillium lecanii* №169.

Фракция 10 состоит из двух компонентов: мажорного и минорного в отношении 2:1. Мажорный компонент фракции 10 — 4-гидроксibenзойная (пара-гидроксibenзойная) кислота, минорный — 4-гидроксibenзиловый спирт. Фармакологические свойства этих соединений не исследованы. Однако изомер пара-гидроксibenзойной кислоты — салициловая кислота (орто-гидроксibenзойная кислота) и её соли (салицилаты) давно известны и используются как противовоспалительные средства. Механизм этого эффекта обусловлен ингибированием факторов транскрипции, активируемых при воспалении [16, 17]. Поскольку атеросклероз —

воспаление сосудов, то этот механизм может реализоваться и в подавлении салицилатами атеросклероза. Салицилаты также препятствуют прикреплению лейкоцитов к эндотелию сосудов (процесс инициирующий атеросклероз), подавляя в клетках эндотелия экспрессию факторов адгезии [17, 18]. Кроме того, в биологических системах салицилаты проявляют себя как эффективные антиоксиданты [19]. Салицилаты подавляют окисление ЛПНП [20]. Роль ингибирования 15-ЛО в этом эффекте не изучалась.

Наработанная с помощью препаративной ВЭЖХ фракция 11 была исследована по всем физико-химическим характеристикам. Для фракции 11 был определен элементарный состав, соответствующий: С — 66,77%, Н — 3,73%, О — 29,60%. По данным МС-анализа, была установлена молекулярная масса $M/Z = 270,05$. Основываясь на данных элементарного состава и молекулярной массы, был проведён предварительный расчёт брутто формулы соединения: $C_{15}H_{10}O_5$. По результатам 1H , ^{13}C , НМВС, NOESY ЯМР-анализа было установлено, что данное вещество является генистеином (5,7-дигидрокси-3-(4-гидроксифенил)-4Н-хромон-4-один) (рис. 8). Известно, что флавоноиды, в том числе и изофлавоны, к которым относится генистеин, уменьшают риск сердечно-сосудистых заболеваний [21]. Существуют данные, показывающие, что существенный вклад в этот эффект даёт снижение флавоноидами окислительного стресса и увеличения концентрации NO в сосудах [22]. Генистеин понижает давление крови, увеличивает экспрессию NO синтазы в эндотелии сосудов [23] и подавляет окисление ЛПНП [24]. Было показано, что другой флавоноид, кверцетин подавляет окисление ЛПНП через ингибирование 15-ЛО [25]. Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют, что генистеин подавляет окисление ЛПНП, по-видимому, также за счёт ингибирования 15-ЛО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чмель Я.В., Бибилова М.В., Спиридонова И.А., Тертов В.В., Катлинский А.В. Скрининг природных соединений с гипополипидемической активностью. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 8—12. / Chmel' Ya.V., Bibikova M.V., Spiridonova I.A., Tertov V.V., Katlinskij A.V. Screening prirodnykh soedinenij s gipolipidicheskoj aktivnost'ju. Antibiotiki i khimioter 2004; 49: 8—12. [in Russian]
2. Бибилова М.В., Пузевская Т.О., Грамматикова Н.Э., Катлинский А.В. Продуценты гипополипидемических соединений с антиоксидантной активностью. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 3—7. / Bibikova M.V., Puzhevskaja T.O., Grammatikova N.E., Katlinskij A.V. Producenty gipolipidemicheskikh soedinenij s antioksidantnoj aktivnost'ju. Antibiotiki i khimioter 2009; 54: 3—7. [in Russian]
3. Пузевская Т.О., Бибилова М.В., Грамматикова Н.Э., Катлинский А.В. Влияние природных гипополипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas*. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 10—13. / Puzhevskaja T.O., Bibikova M.V., Grammatikova N.E., Katlinskij A.V. Vlijanie prirodnykh gipolipidemicheskikh soedinenij na formirovanie biopljonok shtammami roda *Pseudomonas*. Antibiotiki i khimioter 2009; 54: 10—13. [in Russian]
4. Mertens A., Hobvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. FASEB J 2001; 15: 2073—2084.

Заключение

В работе показано, что экстракт комплекса грибов, проявляющий антиатеросклеротическую активность, ингибирует 15-ЛО. Поскольку 15-ЛО участвует в процессах, приводящих к развитию атеросклероза, то ингибирование 15-ЛО может иметь прямое отношение к подавлению развития атеросклероза экстрактом грибов. Ингибирующая 15-ЛО активность экстракта комплекса грибов обусловлена соединениями, содержащимися в одном из трёх грибов комплекса: *Lecanicillium lecanii* №169. Эти соединения были идентифицированы как 4-гидроксibenзойная кислота, 4-гидроксibenзиловый спирт и флавоноид генистеин. Фармакологические эффекты первых двух соединений не исследованы. Полученные данные по ингибированию ими 15-ЛО побуждают к изучению фармакологических эффектов 4-гидроксibenзойной кислоты и 4-гидроксibenзилового спирта, в том числе и их влияния на развитие атеросклероза. Третье идентифицированное в активных фракциях гриба *Lecanicillium lecanii* №169 соединение — флавоноид генистеин, эффекты которого изучены в различных аспектах. Известно, в том числе, что он препятствует развитию атеросклероза. Ингибирование фракцией, содержащей генистеин 15-ЛО, показывает, что часть антиатеросклеротического действия генистеина может быть обусловлена подавлением активности 15-ЛО. Основными продуцентами генистеина являются соя и красный клевер. При этом следует отметить, что в растениях это соединение находится в виде гликозидов. Получение чистого генистеина представляет определённые сложности. В частности, в Японии ведётся поиск ферментов, способных удалять гликозидную часть. Поэтому впервые обнаруженная в работе способность гриба продуцировать чистый генистеин может иметь как теоретическое, так и практическое значение.

5. Tsimikas S., Mallat Z., Talmud P.J., Kastelein J.J., Wareham N.J., Sandhu M.S. et al. Oxidation-specific biomarkers, lipoprotein(a), and risk of fatal and nonfatal coronary events. J Am Coll Cardiol 2010; 56: 946-955.
6. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. С-Петербург: Питер Ком. 1999. / Klimov A.N., Nikul'cheva N.G. Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narushenija. S-Peterburg: Piter Kom. 1999. [in Russian]
7. Fogelman A.M., Schechter J.S., Hokom M., Child J.S., Edwards P.A. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 2214—2218.
8. Sparrow J.T., Parthasarathy S., Steinberg D. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. J Lipid Res 1988; 29: 745—753.
9. Hiltunen T., Luoma J., Nikkari T., Ylä-Herttuala S. Induction of 15-lipoxygenase mRNA and protein in early atherosclerotic lesions. Circulation 1995; 92: 3297—3303.
10. Harats D., Shaish A., George J., Mulkins M., Kurihara H., Levkovitz H. et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. ATVB 2000; 20: 2100—2105.

11. Rapoport S.M., Schewe T., Wiesner R., Halangk W., Ludwig P., Janicke-Hone et al. The lipoxygenase of reticulocytes: purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur J Biochem* 1979; 96: 545—561.
12. Criswell K.A., Sulkanen A.P., Hochbaum A.F., Bleavins M.R. Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar rats. *J Appl Toxicol* 2000; 20: 25—34.
13. Мешикова Н.П., Северина С.Е. Практикум по биохимии. М.: МГУ; 1979. / Meshkova N.P., Severina S.E. Praktikum po biokhimii. M.: MGU; 1979. [in Russian]
14. Maccarone M., Salucci M.L., Melino G., Rosato N., Finazzi-Agro A. The early phase of apoptosis in human neuroblastoma chp100 cells is characterized by lipoxygenase-dependent ultraweak light emission. *Biochem Biophys Res Com* 1999; 265: 758—762.
15. Aoshima H., Kajiwara T., Hatanaka A. Kinetic study of lipoxygenase-hydroperoxylinoic acid interaction. *Biochim Biophys Acta* 1976; 486: 121—126.
16. Kopp E., Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956—959.
17. Pierce J.W., Read M.A., Ding H., Luscinskas F.W., Collins T. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 1996; 156: 3961—3969.
18. Xia L., Pan J., Yao L., McEver R.P. A proteasome inhibitor, an antioxidant, or a salicylate, but not a glucocorticoid, blocks constitutive and cytokine-inducible expression of P-selectin in human endothelial cells. *Blood* 1998; 91: 1625—1632.
19. Sagone A., Husney R. Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems. *J Immunol* 1987; 138: 2177—2183.
20. Hermann M., Kapiotis S., Hofbauer R., Exner M., Seelos C., Held I et al. Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Letters* 1999; 445: 212—214.
21. Maron D. J. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Curr. Atherosclerosis Rep* 2004; 6: 73—78.
22. Grassi D., Desideri G., Ferri C. Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* 2010; 2: 889—902.
23. Si H., Liu D. Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2008; 138: 297—304.
24. Hodgson J.M., Croft K.D., Puddey I.B., Mori T.A., Beilin L.J. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 664—669.
25. Da Silva E. L., Tsushida T., Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch Biochem Biophys* 1998; 349: 313—320.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Бибикина Маргарита Васильевна — д.м.н., генеральный директор ООО «ВИОРИН», Москва

Спиридонова Инна Анатольевна — с.н.с., ООО «ВИОРИН», Москва

Даниленко А.Н. — с.н.с., Институт биохимической физики им. Н.М.Эммануэля РАН, Москва

Корыстова А.Ф. — с.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пушкино

Шапошникова В. В. — к.б.н., с.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пушкино

Корыстов Ю. Н. — д.б.н., зав. лаб., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пушкино

Влияние сульфатированных полисахаридов из бурой водоросли *Fucus evanescens* и продукта их ферментативной трансформации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета

Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Т. П. СМОЛИНА¹, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, А. С. СИЛЬЧЕНКО², Т. И. ИМБС², С. П. ЕРМАКОВА²

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Effect of Sulfated Polysaccharides from Brown Alga *Fucus evanescens* and Their Enzymatic Transformation Product on Functional Activity of Innate Immunity Cells

T. A. KUZNETSOVA¹, T. P. SMOLINA¹, N. N. BESEDNOVA¹, A. S. SILCHENKO², T. I. IMBS², S. P. ERMAKOVA²

¹ G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok

Проведено сравнительное изучение влияния сульфатированных полисахаридов (ПС) из бурой водоросли *Fucus evanescens* и низкомолекулярного продукта ферментативной трансформации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета — полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови человека (NF). В результате контакта NF *in vitro* с образцами ПС зарегистрированы значимые изменения функционального состояния клеток. Это выражалось в усилении плотности молекул CD69, CD14, CD11b на клеточных мембранах с одновременным снижением CD62L и в увеличении показателей фагоцитарной и бактерицидной активности NF. Низкомолекулярный образец, полученный из фукоидана с применением фукоиданаз, оказывает более выраженный эффект на уровень экспрессии молекул CD14, CD11b и CD62L по сравнению с высокомолекулярным.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, фукоиданы, врожденный иммунитет, нейтрофилы, молекулы адгезии, фагоцитарная и бактерицидная активность.

The effect of sulfated polysaccharides (PS) from brown alga *Fucus evanescens* and their enzymatic transformation and low molecular weight product on the functional activity of the innate immunity cells, i.e. polymorphonuclear leukocytes of human peripheral blood (NF) was comparatively studied. The *in vitro* NF contact with PS resulted in significant changes in the functional activity of NF, evident from higher density of molecules CD69, CD14, CD11b on the cell membranes with simultaneous lowering of that of CD62L and increased phagocytic and bactericidal activity of NF. The low molecular weight product resulting from fucoidan transformation with fucoidanases showed a higher effect on the level of the molecules CD14, CD11b and CD62L expression vs. the high molecular weight PS.

Key words: sulfated polysaccharides, fucoidans, innate immunity, neutrophils, adhesion molecules, phagocytic and bactericidal activity.

Введение

Сульфатированные полисахариды (фукоиданы) из бурых водорослей — не токсичные, безопасные и биосовместимые вещества, проявляющие широкий спектр биологической активности, в связи с чем являются перспективным объектом для биомедицинского и фармацевтического применения [1—4]. В частности, активно проводятся исследования по оценке влияния фукоиданов на систему врожденного и адаптивного иммунитета и их адьювантной активности для усиления про-

тивоинфекционного и противоопухолевого иммунного ответа [5—7].

Структура и содержание фукоиданов существенно различается у разных видов водорослей и даже в пределах одного вида в зависимости от климатических условий, местообитания, стадии развития водоросли и способа экстракции [8—10], в то время, как использование сульфатированных полисахаридов (фукоиданов) в качестве лекарственных препаратов, адьювантов и др. ограничено и связано с решением вопросов получения структурно охарактеризованных и однородных образцов с низкой молекулярной массой или их олигомерных фракций.

Целью работы явилось изучение влияния сульфатированных полисахаридов из бурой водо-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 690087, Владивосток, ул. Сельская, д. 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Таблица 1. Характеристики полисахаридов (ПС) из бурой водоросли *Fucus evanescens*

Полисахарид	SO ₃ Na*, (%)	Нейтральные сахара, молярные %				
		Fuc	Gal	Xyl	Man	Glc
Образец 1	27,0	94,1	3,8	2,1	0	0
Образец 2	28,1	94,4	3,5	2,1	0	0
Образец 3	29,7	97,8	2,2	0	0	0

Примечание. * — % от массы.

росли *Fucus evanescens* и продукта их ферментативной трансформации на функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов периферической крови человека (NF).

Материал и методы

Исследовано три образца полисахаридов (ПС), выделенных из бурой водоросли *Fucus evanescens*. Образец 1 — фукоидан в комплексе с полифенолами [11]; образец 2 — фукоидан, освобождённый от полифенолов [12]; образец 3 — продукт ферментативного гидролиза фукоидана [13] (табл. 1). Молекулярная масса образца 1 находится в интервале 130–430 кДа, для образца 2 — в интервале 130–400 кДа, для образца 3 — около 9 кДа.

Влияние образцов ПС *in vitro* на экспрессию поверхностных маркеров NF осуществляли с использованием лейкоцитов периферической крови здоровых доноров. Кровь разводили 1:2 полной питательной средой RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,01 M HEPES, 200 mM L-глутамин, 100 мг/мл гентамицина, и вносили в стерильные пластиковые 24-луночные планшеты («CellStar»). Образцы ПС вносили в лунки в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 24 ч с 5% CO₂, затем кровь ресуспендировали, переносили по 100 мкл в цитометрические пробирки и добавляли по 10 мкл моноклональных антител к поверхностным антигенам лейкоцитов периферической крови CD69-PE, CD14-FITC, CD11b-PE, CD62L-FITC, а также соответствующих изотипических контролей («Beckman Coulter»). Лизис эритроцитов производили с помощью раствора (BD FACSTM Lysing Solution). Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США). Гейтирование субпопуляций гранулоцитов (основную часть которых составляют NF), осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. В качестве контроля использовали кровь в полной питательной среде, инкубируемую без образцов ПС. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ клеток. Результаты, отражающие плотность молекул на поверхности клеток, представлены в виде условных единиц средней интенсивности флуоресценции (MFI mean fluorescence intensity).

Влияние образцов ПС на фагоцитарную и бактерицидную активность исследовали по ранее описанной методике [14], с этой целью из крови здоровых доноров выделяли лейкоциты путём седиментации эритроцитов и доводили до конечной концентрации 2×10⁶/мл, клетки инкубировали с образцами ПС в конечной концентрации 10 и 100 мкг/мл при 37°C в течение 1 ч. Объектом фагоцитоза служил латекс 1,5 мкм (10% полистерольная суспензия, ДИА-М, Россия) в разведении 1:80. Учёт результатов осуществляли микроскопически путём подсчёта фагоцитоза в 100 клетках. Полученные результаты оценивали по фагоцитарному показателю (ФП%) — процент клеток, участвующих в фагоцитозе и фагоцитарному числу (ФЧ) — среднее число латексных частиц, поглощённых одним фагоцитом. Бактерицидную активность NF (продукцию активных форм кислорода) исследо-

вали в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) путём измерения оптической плотности (OD×10⁻³) на спектрофотометре «Multiscan RC «Labsystems» при длине волны 492 нм (референсная волна 620 нм). В качестве контроля использовали лейкоциты, инкубируемые в физиологическом растворе без образцов ПС.

Статистическую обработку цифровых данных проводили непараметрическим методом для связанных групп с помощью пакета программы «Statistica-7». Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При инкубировании исследуемых образцов ПС с цельной кровью наблюдались выраженные изменения функционального состояния NF, регистрируемые по экспрессии поверхностных антигенов (табл. 2). Так, при контакте в течение 24 ч с образцами 1, 2 и 3 в концентрации 100 мкг/мл выявлено статистически значимое увеличение, по сравнению с контролем ($p < 0,01$), плотности маркеров CD69 и CD14 на мембране NF.

CD69 — самый ранний маркер активации, который уже через 30 мин после начала стимуляции транслоцируется из цитоплазмы на клеточную мембрану. Основные функции этого маркера на нейтрофилах сводятся к запуску сигнала трансдукции для продукции провоспалительных цитокинов и оксида азота, стимуляции выхода Ca²⁺ через мембрану, регулированию экзоцитоза гранул нейтрофилов. Рецептор CD14 так же, как и CD69, в основном находится внутри нейтрофилов. При активации клеток CD14 может быстро транслоцироваться на клеточную мембрану и в дальнейшем синтезироваться *de novo*. Его роль в активации нейтрофилов заключается в индукции сигнала, приводящего к продукции TNF- α .

Все образцы в исследуемой концентрации также вызывали статистически значимое увеличение, по сравнению с контролем ($p < 0,01$), плотности молекул CD11b, которые относятся к семейству β_2 -интегринов, участвующих в адгезии лейкоцитов к внеклеточному матриксу и к эндотелию, но преимущественно вовлечённых во взаимодействие лейкоцитов между собой. Активация NF сопровождалась снижением плотности молекул L-селектинов (CD62L), что может являться отражением процесса шеддинга (слущивания с мембраны) и свидетельствовать о готовности NF к миграции. Снижение уровня этих молекул также может быть

Таблица 2. Экспрессия мембранных молекул нейтрофилами цельной крови под влиянием ПС *in vitro*

№ образца (концентрация 100 мкг/мл)	Антигены (маркеры) клеточной мембраны (MFI)				
	CD69	CD14	CD11b	CD62L	SSC
1	86** (48–87)	*46* (43–82)	*2487* (1738–3670)	*58** (45–78)	436* (422–450)
2	91** (51–104)	75** (62–101)	2648* (1839–3631)	41** (30–45)	447** (439–454)
3	90** (49–123)	66* (66–94)	2708* (2341–3894)	41** (29–44)	423* (409–466)
4 (контроль)	28 (22–49)	28 (18–30)	1005 (802–1264)	160 (142–211)	406 (401–418)

Примечание. Показатели Me (медиана) и min-max; $n=6$; справа * – значимость различий по отношению к контрольным показателям (* – $p<0,05$; ** – $p<0,01$); слева * – значимость различий 1 и 2 образца по отношению к 3 образцу (* – $p<0,05$).

Таблица 3. Показатели фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофильных лейкоцитов под влиянием ПС *in vitro*

№ образца (концентрация 10 и 100 мкг/мл)	ФП (%)		ФЧ (усл. ед.)		НСТ (OD×10 ⁻³)	
	10	100	10	100	10	100
1	78,0±5,1*	81,2±5,4*	2,84±0,65*	3,07±0,6*	1642±198**	*1936±109*
2	72,4±4,9	76,6±1,95*	2,66±0,63	2,9±0,29*	1155±126*	1543±363*
3	72,8±7,01	81,0±4,4*	2,62±0,55	2,82±0,38*	1460±180**	1637±172**
4 (контроль)	66,4±3,85		2,14±0,22		775,4±159	

Примечание. Показатели $M\pm\sigma$ $n=5$; справа * – значимость различий по отношению к контрольным показателям (* – $p<0,05$; ** – $p<0,01$); слева * – значимость различий 1 и 2 образца по отношению к 3 образцу (* – $p<0,05$).

обусловлено связываем молекул CD62L с исследуемыми веществами, поскольку известно, что фукоиданы являются лигандами L-селектинов. Кроме того, отмечено увеличение под влиянием всех образцов интенсивности флуоресценции по SSC (показатель бокового светорассеивания) ($p<0,05$), что может свидетельствовать об усилении гранулярности популяции NF.

Сравнительная оценка активности трёх образцов ПС показала, что уровень экспрессии мембранных молекул CD69 и показателя SSC под их влиянием сопоставим (различия показателей между собой статистически незначимы). При сравнении активности образцов 1 и 2 установлено, что образец 2 эффективнее повышал уровень молекул CD14 и снижал уровень CD62L ($p<0,05$). Показатели плотности молекул CD14 и CD11b при инкубировании NF с образцом 1 были выше ($p<0,05$), а молекул CD62L – ниже ($p<0,05$) по сравнению с образцом 3 (табл. 2).

Основными процессами, осуществляемыми NF при фагоцитозе, являются миграция, поглощение объектов фагоцитоза, дегрануляция, внутриклеточный киллинг, образование активных форм кислорода и продукция цитокинов и хемокинов.

При анализе показателей фагоцитарной активности NF, инкубированных с образцом 1 в концентрации 10 и 100 мкг/мл, выявлено статистически значимое увеличение ФП и ФЧ ($p<0,05$). Образцы 2 и 3 оказывали стимулирующее влияние на показатели фагоцитоза только в концентрации 100 мкг/мл ($p<0,05$). Значимых различий в зависимости от вносимой концентрации ПС (10 или 100 мкг/мл) пока-

зателей фагоцитарной активности NF не зарегистрировано (табл. 3).

В отношении показателей бактерицидной активности, регистрируемых в НСТ-тесте, выявлено, что под влиянием всех трёх образцов, инкубированных с лейкоцитами как в концентрации 10 мкг/мл, так и 100 мкг/мл, наблюдалось их статистически значимое увеличение по сравнению с контролем ($p<0,05$), свидетельствующее об усилении продукции активных форм кислорода. Образец 1 продемонстрировал дозозависимость различий показателей НСТ-теста ($p<0,05$).

Сравнительная оценка функциональной активности NF под влиянием исследуемых образцов ПС свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий показателей между собой за исключением показателя НСТ-теста под влиянием образца 1 в концентрации 100 мкг/мл, которые были значимо выше по сравнению с таковыми под влиянием образца 3 в той же концентрации ($p<0,05$) (табл. 3).

Работы по изучению биологической (в т. ч. иммуноадаптивной) активности фукоиданов с различными структурными характеристиками и молекулярными массами разноречивы, а касающиеся активности олигосахаридов фукоидана к тому же и немногочисленны. Например, в работе J. Y. Jang et al. [15], 2014 объектами исследования были высокомолекулярный фукоидан (средняя молекулярная масса 130 кДа) и низкомолекулярный фукоидан (30 кДа), выделенные из *Undaria pinnatifida*. Авторами показано, что 1-й повышал выживаемость спленоцитов мышей и продукцию ими IFN- γ и оксида азота, в то время как 2-ой обладал низкой

иммунотропной активностью и относительно высокой токсичностью по отношению к спленоцитам. В отношении низкомолекулярных фукоиданов, полученных из нативного полисахарида *Sargassum fulvellum*, выявлено предотвращение связывания Р-селектина с антигеном Sialyl Lewis X пропорционально снижению молекулярной массы [16]. Показана дозозависимость эффектов низкомолекулярного фукоидана (4 кДа) по ингибированию выживаемости и индукции апоптоза фибробластоподобных синовиоцитов ревматоидного артрита, стимулированных IL-1 β , снижению экспрессии и секреции металлопротеиназ-1, -3 и -9 и подавлению ДНК-связывающей активности ядерного фактора NF- κ B [17].

В работах, посвящённых оценке функциональной активности фагоцитов, было показано усиление под влиянием фукоиданов экспрессии мембранных рецепторов (маркеров адгезии и продукции цитокинов), а также поглотительной и микробицидной активности [18, 19, 20], однако, вопросы структурно-функциональных взаимосвязей в них не освещались.

Выявленная нами активация NF в результате контакта с ПС и продуктом их ферментативной трансформации регистрировалась как по экспрессии поверхностных антигенов, так и при оценке эффекторных функций (фагоцитарной и бактерицидной активности).

Сравнительная оценка исследуемых образцов показала большую активность образца 3 по сравнению с образцом 1 по экспрессии на мембране NF сигнальных молекул CD14 и молекул адгезии

CD11b и CD62L, в то же время уровень экспрессии молекул CD69 и показателя SSC статистически не различались. Также не выявлено значимых различий показателей фагоцитоза и бактерицидности NF под влиянием исследуемых ПС.

Это заключение представляет большой практический интерес, поскольку низкомолекулярный продукт, полученный из фукоидана с применением фукоиданаз (образец 3), имеет стабильную структуру, что позволяет рассматривать возможность его использования в качестве фармацевтической субстанции или адъюванта в составе вакцинных препаратов.

Выводы

1. Влияние образцов сульфатированных ПС и продукта их ферментативной трансформации на рецепторы клеток врождённого иммунитета (NF) приводит к изменению уровня их экспрессии: увеличению плотности маркеров CD69 и CD14 и молекул адгезии CD11b, снижению плотности молекул L-селектина CD62L.

2. Исследуемые образцы ПС оказывают стимулирующее влияние на показатели фагоцитарной (ФП и ФЧ) и бактерицидной активности (в НСТ-тесте).

3. При сравнительной оценке активности исследуемых образцов ПС установлено, что низкомолекулярный образец, полученный из фукоидана с применением фукоиданаз, оказывает более выраженный эффект на уровень экспрессии молекул CD14, CD11b и CD62L по сравнению с высокомолекулярным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. Therapies from fucoidan: an update. *Mar Drugs* 2015; 13: 9: 5920—5946.
2. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs* 2011; 9: 2: 196—223.
3. Pomin V.H. Marine non-glycosaminoglycan sulfated glycans as potential pharmaceuticals. *Pharmaceuticals* 2015; 8: 4: 848—864.
4. Raposo M.F.J., Morais A.M.B.M., Morais R.M.S.C. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs* 2015; 13: 5: 2967—3028.
5. Jin J.O., Zhang W., Du J.Y. et al. Fucoidan can function as an adjuvant *in vivo* to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. *PLoS One* 2014; 9 (6).
6. Kim S.Y., Joo H.G. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci* 2015; 16: 2: 145—150.
7. Lin C.C., Pan I.H., Li Y.R. et al. The adjuvant effects of high-molecular-weight polysaccharides purified from *Antrodia cinnamomea* on dendritic cell function and DNA vaccines. *PLoS One* 2015; 10 (2).
8. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E. et al. A comparative study of antiinflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007; 31: 2: 541—552.
9. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J Exp Marine Biol Ecol* 2003; 294: (1): 1—13.
10. Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida*. *J Appl Phyc* 2010; 22: 1: 79—86.
11. Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. Structural similarities of fucoidans from brown algae *Silvetia babingtonii*

and *Fucus evanescens*, determined by tandem MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydrate Research* 2012; 358: 78—81.

12. Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N. Antioxidant activity of fucoise-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods. *J App Phycol* 2015; 27: 1: 545—553.
13. Сильченко А.С. Фукоиданазы и альгинат-лиазы морской бактерии *Formosa algae* КММ 3553Т и морского моллюска *Lambis* sp.: автореф. дис. канд. хим. наук: Владивосток. 2014; 24. / Sil'chenko A.S. Fukoidanazy i al'ginat-liazy morskoy bakterii *Formosa algae* КММ 3553Т i morskogo molljushka *Lambis* sp.: avtoref. dis. kand. him. nauk: Vladivostok. 2014; 24. [in Russian]
14. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО. 1995; 219. / Haitov R.M., Pinegin B.V., Istamov H.I. Jekologicheskaja immunologija. M.: VNIRO. 1995; 219. [in Russian]
15. Jang J.Y., Moon S.Y., Joo H.G. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol* 2014; 68: 234—238.
16. Jo B.W., Choi S.K. Degradation of fucoidans from *Sargassum fulvellum* and their biological activities. *Carbohydr Polym* 2014; 111: 822—829.
17. Shu Z., Shi X., Nie D., Guan B. Low-molecular-weight fucoidan inhibits the viability and invasiveness and triggers apoptosis in IL-1 β -treated human rheumatoid arthritis fibroblast synoviocytes. *Inflammation* 2015; 38: 5: 1777—1786.
18. Teruya T., Takeda S., Tamaki Y., Tako M. Fucoidan isolated from *Laminaria angustata* var. *longissima* induced macrophage activation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 9: 1960—1962.
19. Jiang Z., Okimura T., Yamaguchi K., Oda T. The potent activity of sulfated polysaccharide, ascophyllan, isolated from *Ascophyllum nodosum* to induce nitric oxide and cytokine production from mouse macrophage RAW264.7 cells: comparison between ascophyllan and fucoidan. *Nitric Oxide* 2011; 25: 4: 407—415.
20. Jin J.O., Yu Q. Fucoidan delays apoptosis and induces pro-inflammatory cytokine production in human neutrophils. *Int J Biol Macromol* 2015; 73: 65—71.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д.м.н., зав. лаб. иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова; Владивосток

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

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

Сильченко Артем Сергеевич — к.х.н., научный сотрудник лаборатории химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Имбс Татьяна Игоревна — к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Ермакова Светлана Павловна — д.м.н., зав. лабораторией химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Токсикологическое исследование внутривенной формы рифапентина

К. П. ОСТРОВСКИЙ¹, Э. Р. ПЕРЕВЕРЗЕВА², И. Д. ТРЕЩАЛИН², Н. С. ОСИПОВА¹, М. И. ТРЕЩАЛИН²,
Е. В. ВОЗНЯКОВСКАЯ², В. Ю. БАЛАБАНЬЯН¹, О. О. МАКСИМЕНКО¹, С. Э. ГЕЛПЕРИНА¹

¹ ООО «Технология лекарств», Химки, Московская область

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва

Toxicological Evaluation of Intravenous Formulation of Rifapentine

K. P. OSTROVSKIY¹, E. R. PEREVERZEVA², I. D. TRESHCHALIN², N. S. OSIPOVA¹, M. I. TRESHCHALIN²,
E. V. VOZNYAKOVSKAYA², V. YU. BALABANYAN¹, O. O. MAKSIMENKO¹, S. E. GELPERINA¹

¹ Drugs Technology LLC, Khimki, Moscow Region

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

Антибиотики рифамицинового ряда являются одним из наиболее эффективных средств для лечения туберкулёза. Однако получение и применение препаратов на их основе затруднено низкой растворимостью субстанции в воде и выраженным токсическим действием. Для рифапентина ранее была разработана технология получения внутривенной формы на основе человеческого сывороточного альбумина и оценена её противотуберкулёзная активность. Целью настоящего исследования являлась оценка токсического действия полученной лекарственной формы. Было установлено, что значение LD₅₀ для внутривенной формы рифапентина составляет 340 мг/кг, что позволяет отнести её к малотоксичным веществам. В хроническом эксперименте перорально вводимая субстанция рифапентина и внутривенная форма проявляли одинаковое токсическое действие, однако парентеральная форма отличалась отсутствием гастроинтестинальной токсичности и кардиотоксичности.

Ключевые слова: малорастворимые субстанции, антибиотики, туберкулёз, рифапентин, острая токсичность, хроническая токсичность.

Rifapentine belongs to the most potent antituberculosis drugs. Nevertheless, there are some limitations for its clinical use because of the low aqueous solubility and side effects. A technological approach to development of rifapentine intravenous formulation based on human serum albumin was described earlier and its efficacy against experimental tuberculosis was estimated. Toxicological evaluation of that water-compatible form of rifapentine revealed its low acute toxicity (LD₅₀ 340 mg/kg). Chronic toxicity tests of both the oral substance and the injectable formulation of rifapentine demonstrated similar adverse effects. However, in contrast to the conventional oral formulations, the intravenous formulation of rifapentine had no gastrointestinal toxic effects or cardiotoxicity, thus suggesting its usefulness for clinical application.

Key words: poor soluble antibiotics, tuberculosis, rifapentine, acute toxicity, chronic toxicity.

Введение

Туберкулёз остаётся одним из самых опасных инфекционных заболеваний в мире. Наиболее эффективным средством его лечения в настоящее время являются антибиотики рифамицинового ряда. Их преимущество заключается в стерилизующей активности, что характерно лишь для немногих противотуберкулёзных антибиотиков [1].

В настоящее время среди антибиотиков рифамициновой группы наиболее часто используется рифампицин, который включён в стандартную схему лечения туберкулёза, рекомендованную ВОЗ [1, 2]. Рифапентин, применяемый с 1998 г., сопоставим с рифампицином по токсичности и противо-

туберкулёзному действию [3, 4], однако имеет примерно в 5 раз больший период полувыведения [5, 6], что позволяет применять его 2 раза в неделю в продолжительной фазе лечения и, тем самым, улучшить переносимость комбинированной химиотерапии и снизить стоимость лечения [7].

Применение технологии солюбилизации рифапентина с помощью человеческого сывороточного альбумина позволило разработать коллоидную водосовместимую форму рифапентина, пригодную для внутривенного введения [8]. Сравнительное исследование *in vivo* выявило равную эффективность внутривенной и пероральной форм рифапентина в отношении острой туберкулёзной инфекции у мышей [9].

Предполагалось, что инъекционное введение рифапентина позволит уменьшить его неблагоприятное воздействие на органы ЖКТ и снизить

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 141400, Московская область, г. Химки, ул. Рабочая, д. 2А, ООО «Технология лекарств»

системную токсичность, благодаря увеличению степени связывания с белком.

Цель работы — изучение токсичности внутривенной формы рифапентина в остром и хроническом эксперименте в сравнении с пероральной вводимой субстанцией.

Материал и методы

Водосовместимую форму рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина получали методом ультразвуковой гомогенизации. Смесь рифапентина (Luohe Nanjiesun Pharmaceutical Group Pharmacy, Китай), растворённого в дихлорметане (Химмед, Россия), и водного раствора человеческого сывороточного альбумина (Baxter, Австрия) эмульгировали с помощью ультразвукового гомогенизатора (Sonopuls HD2070, Bandelin, Германия). Образовавшуюся в результате суспензию фильтровали через пористый стеклянный фильтр с размером пор № 1, добавляли в качестве криопротектора 5% маннита, замораживали (-70°C) и высушивали в течение 2 сут в лиофильной сушке (Alpha-Christ 2—4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Германия). Содержание рифапентина в лиофилизате определяли спектрофотометрическим методом. Средний диаметр частиц и распределение частиц по размерам (индекс полидисперсности) определяли методом фотонно-корреляционной спектроскопии с помощью анализатора наночастиц (Malvern Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments, Великобритания). Агрегационную устойчивость (ресуспендируемость) образцов препарата после лиофилизации считали удовлетворительной, если после добавления исходного объёма воды в лиофилизат образовывалась однородная коллоидная система без видимых агрегатов и осадка, устойчивая не менее 4 ч при температуре 4°C .

Эксперименты на животных выполнялись в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [10]. Животные содержались в стандартных условиях, получая корм и воду *ad libitum*.

Для определения острой токсичности были использованы самки мышей BDF1. Коллоидную форму вводили однократно в хвостовую вену в диапазоне доз 100—500 мг/кг, субстанцию рифапентина вводили с помощью зонда в желудок в диапазоне доз 4000—14000 мг/кг. Перед введением лиофилизат растворяли в воде для инъекций, субстанцию рифапентина диспергировали в 1% крахмальном клейстере. Каждая экспериментальная группа содержала по 6 животных.

За животными наблюдали в течение 1 мес после последнего случая гибели животного. Учитывали долю павших мышей в каждой группе. Дозы, характеризующие токсичность субстанции и водосовместимой формы рифапентина, рассчитывали по методу Литчфилда и Уилкоксона [11] при помощи компьютерной программы StatPlus 2006.

Изучение хронической токсичности было проведено на половозрелых неинбредных крысах самцах, массой 170—190 г, полученных из Центрального питомника «Андреевка».

После двухнедельного карантина, животные были разделены на 6 групп по 10 голов в каждой. Введение осуществлялось ежедневно в течение 15 сут в разовых дозах, соответствующих $1/15$ LD₅₀ и $1/15$ МПД. Субстанцию рифапентина вводили перорально, коллоидную форму — внутривенно. Разовые дозы растворимой лекарственной формы составляли 11,53 мг/кг и 9,27 мг/кг. Они были рассчитаны, исходя из результатов исследования острой токсичности на мышах, с использованием метаболических коэффициентов пересчёта [12]. Поскольку при изучении острой токсичности субстанции гибели мышей достигнуть не удалось, из имеющихся данных литературы [13, 14] были взяты усреднённые значения

LD₅₀ и МПД для крыс. Разовые дозы рифапентина при пероральном введении равнялись 166,67 и 83,33 мг/кг.

Оценку токсического воздействия препарата осуществляли в соответствии с правилами экспериментального изучения фармакологических веществ [15]. В ходе эксперимента проводили визуальный, инструментальный и лабораторный контроль состояния животных. Массу тела крыс определяли каждые 5 дней при помощи весов «Сартогосм» (Россия). Клинический анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоформула и гематокрит) производили на 0-, 7- и 15-й дни во время курса и на 1-, 3-, 5-, 7-, 10- и 15-й дни по окончании курса введений («Abacus Junior Vet», Швейцария). На 1-й и 15-й день после курса в сыворотке крови определяли аланиновую (АЛТ) и аспарагиновую (АСТ) аминотрансферазы, щелочную фосфатазу (ЩФ), креатинин, мочевины, билирубин (прямой и общий), общий белок, альбумин, глюкозу (Chem Well, США). На эти же сроки регистрировали ЭКГ во втором стандартном отведении (ЭКГ1Т-07, Россия), определяли суточный диурез и производили клинический анализ мочи (Laura Smart Лахема, Чехия).

На 1-е и 15-е сутки после окончания курса введений препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии. Сердце, печень, почки, тимус и селезёнку взвешивали и определяли их массовые коэффициенты. Участки внутренних органов фиксировали в 10% нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином-эозином.

Полученные количественные данные обрабатывали статистически при помощи компьютерной программы StatPlus 2006 с использованием критерия t Фишера—Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для исследования острой токсичности использовали суспензию рифапентина, стабилизированную сывороточным альбумином человека, со средним содержанием рифапентина $9,86 \pm 0,31$ мг/мл, средний диаметр частиц в суспензии составлял 565 ± 5 нм, а индекс полидисперсности был равен $0,208 \pm 0,023$.

Для исследования хронической токсичности использовали меньшие концентрации рифапентина: среднее содержание рифапентина в суспензии составляло $5,53 \pm 0,15$ мг/мл, средний диаметр частиц суспензии 517 ± 8 нм, индекс полидисперсности был равен $0,212 \pm 0,019$. Для изучения токсических свойств плацебо был получен лиофилизат человеческого сывороточного альбумина с маннитом (размер частиц около 10 нм).

При пероральном введении субстанции рифапентина в диапазоне доз от 4000 до 14000 мг/кг гибели животных достигнуть не удалось. Изменений в состоянии и поведении мышей отмечено не было. Этот результат не противоречит данным литературы: для различных образцов субстанции рифапентина значение LD₅₀ может колебаться от 3000 до 18000 мг/кг [14]. Столь широкий диапазон, по-видимому, связан с тем, что скорость растворения и, соответственно, биодоступность рифапентина существенно зависят от степени его кристалличности и условий выделения/кристаллизации [16, 17].

Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови крыс

Группа	Билирубин общий, мкмоль/л	Билирубин прямой, мкмоль/л	Щелочная фосфатаза, ед./л
1-е сутки после курса			
Рифапентин коллоидная форма; Σ МПД	6,7 $\pm$ 1,1	6,7 $\pm$ 1,3	426,2 $\pm$ 126,4
Рифапентин коллоидная форма; Σ LD ₅₀	6,6 $\pm$ 3,3	8,0 $\pm$ 2,0	428,0 $\pm$ 75,1*
Рифапентин субстанция; Σ МПД	14,7 $\pm$ 2,2*	13,8 $\pm$ 2,0*	563,1 $\pm$ 79,3*
Рифапентин субстанция; Σ LD ₅₀	19,4 $\pm$ 3,6*	16,8 $\pm$ 2,2*	539,1 $\pm$ 42,1*
Плацебо	2,9 $\pm$ 2,0	5,6 $\pm$ 1,6	242,0 $\pm$ 66,4
Контроль интактный	6,2 $\pm$ 1,9	9,6 $\pm$ 2,6	302,1 $\pm$ 41,6

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — различия достоверны ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактным контролем.

При внутривенном введении коллоидной формы рифапентина в смертельных дозах гибель животных наступала в течение 1,5 ч после инъекции. Более низкие дозы препарата приводили к гибели животных в течение 1 сут. Исходя из картины гибели, можно предположить, что при введении высоких доз причиной смерти животных является нейротоксичность, при применении более низких доз — сердечно-лёгочная недостаточность.

При расчёте токсикометрических показателей установлено, что при внутривенном введении коллоидной формы рифапентина самкам мышей BDF1 величина LD₅₀ = 340,0 (308,9 $\div$ 371,1) мг/кг, LD₁₀ = 273,3 мг/кг; LD₁₆ = 288,0 мг/кг; LD₈₄ = 392,1 мг/кг; LD₁₀₀ = 418,1 мг/кг.

Таким образом, токсические дозы растворимой формы рифапентина при внутривенном введении, по крайней мере, на порядок выше токсических доз субстанции рифапентина при пероральном применении. При этом, в случае внутривенной формы диапазон токсических и переносимых доз весьма узок, однако, терапевтическая широта препарата достаточно велика, т.к. лечебная доза для мышей составляет 20 мг/кг.

Исследование хронической токсичности показало, что и субстанция рифапентина, и его коллоидная лекарственная форма хорошо переносятся животными. В течение эксперимента ни в одной из групп не было отмечено гибели, отклонений в поведенческих реакциях, изменений состояния кожи и волосяного покрова. У крыс, получавших субстанцию рифапентина, видимые слизистые оболочки и подкожная жировая ткань окрашивались в жёлтый цвет. У крыс, получавших инъекционную форму препарата, видимые слизистые оболочки сохраняли бледно-розовую окраску, влажность их не изменялась, симптомы бронхита, конъюнктивита и ринита отсутствовали, что свидетельствует об отсутствии у препарата ярко выраженного общетоксического действия.

При биохимическом исследовании сыворотки крови животных, получавших рифапентин перорально, на 1-е сутки по окончании курса введений было выявлено повышение содержания прямого и общего билирубина и щелочной фос-

фатазы, которое не зависело от дозы субстанции. Достоверное повышение уровня щелочной фосфатазы было отмечено и у животных, получавших коллоидную форму препарата в высокой дозе. Через 15 сут после окончания введений биохимические показатели во всех подопытных группах возвращались к уровню контроля (табл. 1).

Повышение этих показателей — свидетельство гепатотоксического действия рифапентина. Гепатотоксичность — наиболее частый побочный эффект противотуберкулёзных препаратов, в том числе, рифамицинов [18]. При клинических исследованиях, проведённых на здоровых добровольцах и больных, получавших рифапентин в составе стандартной схемы лечения туберкулёза, рекомендованной ВОЗ, было показано, что препарат вызывает гепатиты, которые проявляются в виде билирубинемии, желтухи, гепатомегалии [19—21]. Гипербилирубинемия — результат конкурентного взаимодействия рифамицинов и желчи за пути экскреции [21]. В нашем исследовании, в отличие от перорального введения субстанции, применение инъекционной формы рифапентина не приводило к повышению уровня билирубина в сыворотке крови, что, по-видимому, связано с медленным высвобождением препарата из комплекса белок—антибиотик и, соответственно, с меньшей конкуренцией за пути выведения. Тем не менее, уровень щелочной фосфатазы, маркера холестаза [22], повышался, но только при использовании высоких доз коллоидной формы. Признаки гепатомегалии в виде повышения массовых коэффициентов печени на 15-е сут по окончании курса введений были отмечены при применении как субстанции, так и коллоидной формы рифапентина (табл. 2).

Наиболее значимые показатели гепатотоксичности — уровни АЛТ и АСТ (ферменты-маркеры цитолиза гепатоцитов [23]), повышение которых в сыворотке крови больных в 3—4 раза служит сигналом для отмены терапии [24], не отличались от контроля. При этом при патоморфологическом исследовании в печени крыс, получавших как субстанцию рифапентина, так и коллоидную форму, были выявлены множественные очаги микронекроза различных размеров,

Таблица 2. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс

Группа	Селезёнка, масс. %	Почка, масс. %	Печень, масс. %
1-е сутки после курса			
Рифапентин коллоидная форма; Σ МПД	0,36 $\pm$ 0,04*	0,36 $\pm$ 0,02*	3,23 $\pm$ 0,25
Рифапентин коллоидная форма; Σ LD ₅₀	0,43 $\pm$ 0,07*	0,34 $\pm$ 0,02*	3,24 $\pm$ 0,23
Рифапентин субстанция; Σ МПД	0,48 $\pm$ 0,09*	0,36 $\pm$ 0,03*	3,32 $\pm$ 0,21
Рифапентин субстанция; Σ LD ₅₀	0,42 $\pm$ 0,06*	0,35 $\pm$ 0,02*	3,38 $\pm$ 0,16
Плацебо	0,29 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,01	2,85 $\pm$ 0,16
Контроль интактный	0,26 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,02	2,84 $\pm$ 0,29
15-е сутки после курса			
Рифапентин коллоидная форма; Σ МПД	0,27 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,02	2,74 $\pm$ 0,09*
Рифапентин коллоидная форма; Σ LD ₅₀	0,30 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,12	2,77 $\pm$ 0,22*
Рифапентин субстанция; Σ МПД	0,31 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,01	2,79 $\pm$ 0,23*
Рифапентин субстанция Σ LD ₅₀	0,31 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,02	2,72 $\pm$ 0,21*
Плацебо	0,27 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,02	2,44 $\pm$ 0,16
Контроль интактный	0,23 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02	2,31 $\pm$ 0,07

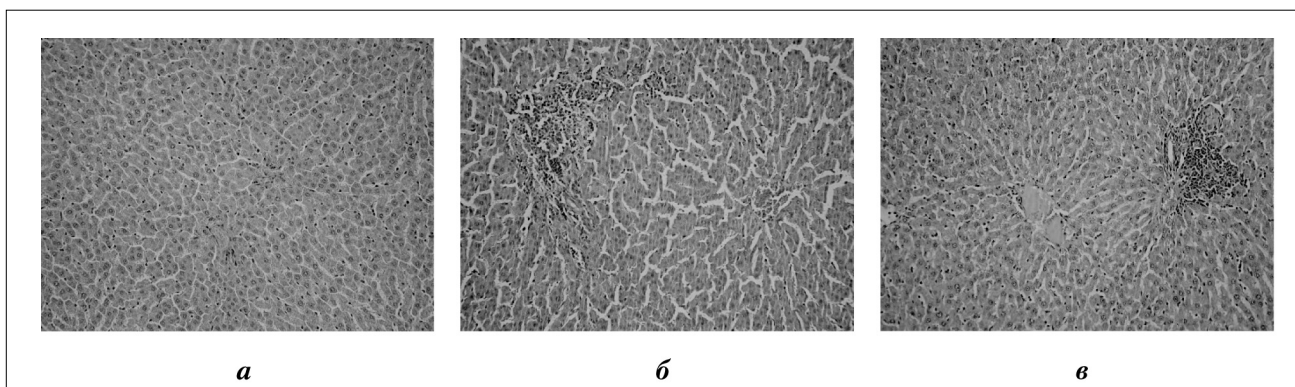


Рис. 1. Микрофотографии печени крысы. $\times 20$.

а — интактный контроль; б — рифапентин субстанция. Σ LD₅₀. 1-е сутки после курса. Очаг микро-некроза вблизи портального тракта; в — рифапентин коллоидная форма. Σ LD₅₀. 1-е сутки после курса. Очаг микро-некроза вблизи портального тракта.

расположенные вблизи портальных трактов и центральных вен (рис. 1), которые длительно сохранялись и в некоторых случаях подвергались фиброзу. По-видимому, механизмы токсического повреждения печени при связывании рифапентина с альбумином не изменяются, и так же, как в случае использования других рифамицинов, основаны на образовании избытка прооксидантных соединений, образуемых при активации изоферментов цитохрома P-450 [23, 25].

Рифапентин в режиме монотерапии не применяется. При комбинировании с другими противотуберкулёзными препаратами (пиразинамидом, изониазидом и этамбутолом) в рандомизированном клиническом исследовании было показано, что замена рифампицина на рифапентин в схеме лечения активного лёгочного туберкулёза не приводит к изменению токсикологического профиля комбинации препаратов. В обоих случаях и с одинаковой частотой регистрируются проявления гематотоксичности (анемия, лейкоцитопения, лейкоцитоз, нейтропения, лимфоцитопения, тромбоцитопения, тромбоцитоз, лимфоаденопатия), гастроинтестинальной токсичности в виде

тошноты, рвоты, диареи. Менее чем в 1% случаев наблюдали гастриты, гастроэнтериты, эзофагиты, панкреатиты, псевдомембранозный энтероколит, сердечно-сосудистую патологию в виде тахикардии, сердцебиений, перикардитов. Лёгочная патология выражалась в пневмонитах и лёгочном фиброзе [21, 26].

В нашем исследовании при проведении общего анализа периферической крови признаков гематотоксичности не выявлено ни в одной из подопытных групп. При патоморфологическом исследовании селезёнки и лимфоузлов животных, получавших субстанцию и лекарственную форму рифапентина в высокой дозе, была отмечена умеренная атрофия лимфоидной ткани, которая выражалась в уменьшении размеров части фолликулов. Увеличение массовых коэффициентов селезёнки во всех подопытных группах на 1-е сутки после курса введений, по-видимому, связано с полнокровием красной пульпы, вызываемым как субстанцией, так и коллоидной формой рифапентина (табл. 2).

Патоморфологическое исследование показало, что 15-кратное пероральное введение рифа-

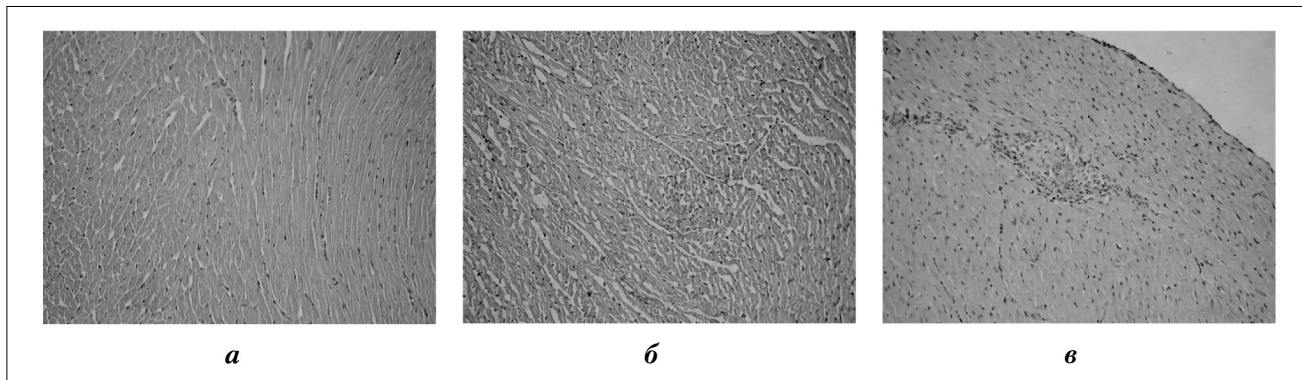


Рис. 2. Микрофотографии миокарда крысы. $\times 20$. а – интактный контроль; б – рифапентин субстанция. $\Sigma\text{ЛД}_{50}$. 1-е сутки после курса. Умеренный отёк интерстиция, мелкий очаг деструкции кардиомиоцитов; в – рифапентин субстанция. $\Sigma\text{ЛД}_{50}$. 15-е сутки после курса. Некроз кардиомиоцитов вокруг артерии.

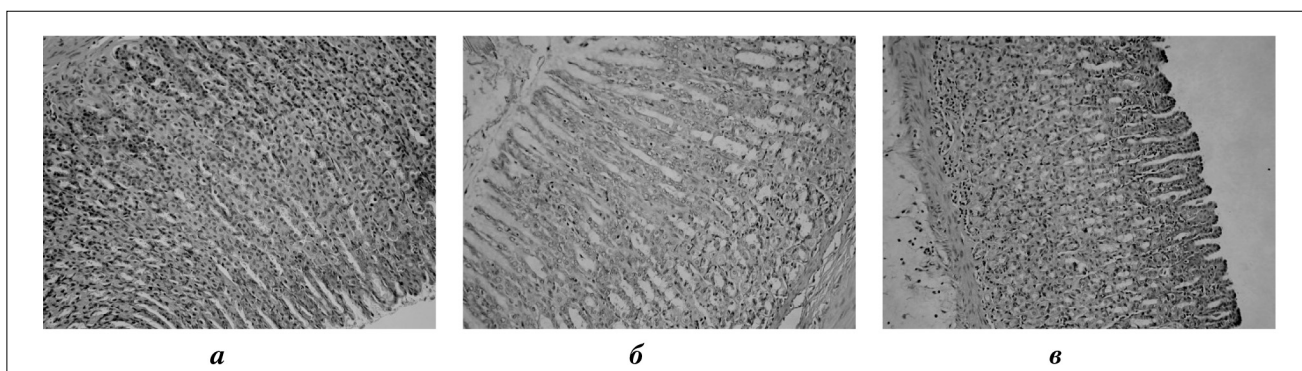


Рис. 3. Микрофотографии желудка крысы. $\times 20$. а – интактный контроль; б – рифапентин субстанция. $\Sigma\text{ЛД}_{50}$. 1-е сутки после курса. Глубокая атрофия эпителия желёз с замещением покровно-ямочным эпителием; в – рифапентин субстанция. $\Sigma\text{ЛД}_{50}$. 15-е сутки после курса. Истончение слизистой оболочки.

пентина в субстанции так же, как внутрибрюшинное применение водосовместимой формы, в дозе, суммарно составляющей LD_{50} , приводит к повреждению морфологического строения тканей сердца, почек, лёгкого, поджелудочной железы.

Степень выраженности кардиотоксического действия субстанции и водосовместимой формы различна. Повреждающее действие субстанции рифапентина на ткань сердца сохраняется длительно и выражается в умеренном очаговом отёке интерстиция, мелкоочаговой токсической кардиомиопатии и деструкции кардиомиоцитов (рис. 2). При применении коллоидной формы умеренный очаговый отёк миокарда и единичные мелкие лимфогистиоцитарные инфильтраты под перикардом были выявлены только у 1 животного, получавшего препарат в высокой дозе.

Нефротоксические свойства как субстанции рифапентина, так и его коллоидной формы, морфологически проявляются у части животных. Однако, в отличие от субстанции, растворимая лекарственная форма препарата оказывает повреждающее действие не только на канальцевую, но и на клубочковую систему почек.

Патологические изменения в лёгких у животных, получавших как субстанцию, так и растворимую лекарственную форму рифапентина в дозе, суммарно составляющей LD_{50} , проявляются на 1-е сутки после курса и сохраняются до конца наблюдения, завершаясь, в ряде случаев, фиброзом.

Изменения, возникающие у части животных в экзокринной и эндокринной зоне поджелудочной железы под действием инъекционной формы рифапентина, применённой в высокой дозе, по характеру повреждающего действия, его интенсивности и длительности аналогичны изменениям, возникающим под влиянием субстанции рифапентина.

При применении коллоидной формы рифапентина в дозе, суммарно составляющей МПД, повреждающее действие препарата проявляется в печени и экзокринной части поджелудочной железы. Морфологически оно идентично воздействию субстанции и выражается в виде единичных мелкоочаговых деструктивных изменений, которые в печени носят стойкий характер, а в поджелудочной железе в течение 15 сут подвергаются репарации. В отличие от субстанции рифапентина,

использование растворимой лекарственной формы в дозе, суммарно составляющей МПД, приводит к кратковременному нарушению фильтрационной функции клубочков юкстамедуллярной зоны почек у части животных, которое проявляется в виде расширения просвета капсулы клубочков и вакуолизации эндотелия их капилляров.

Пероральное введение субстанции рифапентина оказывает повреждающее действие на слизистую оболочку всех отделов желудочно-кишечного канала. В желудке (рис. 3) и тощей кишке оно выражается в глубоких и длительных атрофических и деструктивных изменениях, в подвздошной кишке выражено умеренно и завершается полным восстановлением, в толстой кишке проявляется не у всех животных, но в ряде случаев завершается фиброзом.

При применении субстанции рифапентина в МПД структура слизистой оболочки желудка и тощей кишки полностью восстанавливается в течение двух недель, морфологическое строение подвздошной и толстой кишки не изменяется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aristoff P.A., Garcia G.A., Kirchhoff P.D., Showalter H.D. Rifamycins — obstacles and opportunities. *Tuberculosis* (Edinb) 2010; 90: 2: 94—118.
2. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2009.
3. Arioli V., Berti M., Carniti G., Randisi E., Rossi E., Scotti R. Antibacterial activity of DL 473, a new semisynthetic rifamycin derivative. *J Antibiot* 1981; 34: 8: 1026—1032.
4. Dawson R., Narunsky K., Carman D., Gupta N., Whitelaw A., Efron A. et al. Two-stage activity-safety study of daily rifapentine during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19: 7: 780—786.
5. Rifapentine — a new edge to tuberculosis therapy. Latest Reviews [online]. 2005; 1: 3. URL: <http://www.pharmainfo.net/latest-reviews>.
6. Burman W.J., Gallicano K., Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 5: 327—341.
7. Temple M.E., Nahata M.C. Rifapentine: its role in the treatment of tuberculosis. *Ann Pharmacother* 1999; 33: 11: 1203—1210.
8. Островский К.П., Осипова Н.С., Ванчугова Л.В., Шипуло Е.В., Переверзева Э.Р., Трещалин И.Д. и соавт. Использование белков для повышения растворимости рифапентина в воде. *Хим-фарм журнал*. в печати 2016. / *Ostrovskij K.P., Osipova N.S., Vanchugova L.V., Shipulo E.V., Pereverzeva E.R., Treshhalin I.D. i soavt. Ispol'zovanie belkov dlya povysheniya rastvorimosti rifapentina v vode. Khim-farm zhurnal. v pechati* 2016. [in Russian]
9. Островский К.П., Осипова Н.С., Ванчугова Л.В., Шипуло Е.В., Потанов В.Д., Переверзева Э.Р. и соавт. Исследование эффективности внутривенной формы рифапентина на модели экспериментального туберкулеза у мышей. *Хим-фарм журнал*. в печати 2016. / *Ostrovskij K.P., Osipova N.S., Vanchugova L.V., Shipulo E.V., Potanov V.D., Pereverzeva E.R. i soavt. Issledovanie jeffektivnosti vnutrivennoj formy rifapentina na modeli jeksperimental'nogo tuberkuljoza u myshej. Khim-farm zhurnal. v pechati* 2016. [in Russian]
10. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes ETS No. 123; 1986.
11. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Ленинград: Государственное издательство медицинской литературы; 1963; 81—106. / *Belen'kij M.L. Jelementy kolichestvennoj ocenki farmakologicheskogo jeffekta. Leningrad: Gosudarstvennoe izdatel'stvo medicinskoj literatury*; 1963; 81—106. [in Russian]
12. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P., Schmidt L.H., Skipper H.E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* 1966; 50: 4: 219—244.

Заключение

Токсические эффекты рифапентина, выявленные в данном исследовании, в целом соответствуют вышеупомянутым данным литературы. Преимущество инъекционной формы рифапентина заключается в отсутствии гастроинтестинальной токсичности и кардиотоксичности. По-видимому, можно говорить и об ослаблении гепатотоксичности, т.к. гипербилирубинемия не была зарегистрирована даже при использовании коллоидной формы в дозе, суммарно составляющей LD₅₀. Это позволяет предположить, что в терапевтических дозах препарат не проявит гепатотоксических свойств. При значительной передозировке парентеральной лекарственной формы возможно нарушение фильтрационной функции почек. В остальном, побочные реакции, возникающие при применении рифапентина, не зависят от пути введения и лекарственной формы препарата.

13. Sigma-Aldrich. Rifapentine safety data sheet [online]. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0533?lang=en®ion=RU>.
14. Center for Drug Evaluation and Research. Priftin. Pharmacologist's Review. NDA-752 [online]. URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/021024a-2.pdf.
15. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012; 13—24. / *Mironov A.N. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Ch. 1. M.: Grif i K; 2012; 13—24. [in Russian]*
16. Zhou K., Li J., Luo J., Zheng D. Crystal modification of rifapentine using different solvents. *Frontiers Chem Eng China* 2010; 4: 1: 65—69.
17. Zhou K., Li J., Zheng D.S. Growth, characterization and crystal structure analysis of rifapentine. *J Molecular Structure* 2010; 983: 27—31.
18. Yew W.W., Leung C.C. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology* 2006; 11: 6: 699—707.
19. Dorman S.E., Goldberg S., Stout J.E., Muzanyi G., Johnson J.L., Weiner M. et al. Substitution of rifapentine for rifampin during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis: study 29 of the tuberculosis trials consortium. *J Infect Dis* 2012; 206: 7: 1030—1040.
20. Dooley K.E., Bliven-Sizemore E.E., Weiner M., Lu Y., Nuermberger E.L., Hubbard W.C. et al. Safety and pharmacokinetics of escalating daily doses of the antituberculosis drug rifapentine in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 91: 5: 881—888.
21. Food and Drug Administration. Priftin. Full prescribing information [online]. 2010; URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/021024s008lbl.pdf.
22. Ельчанинова С.А., Роитман А.П. Ферменты. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. Т. 1. М.: ГЭОТАР Медиа; 2012; 177—192. / *El'chaninova S.A., Rojtmann A.P. Fermenty. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika: nacional'noe rukovodstvo. T. 1. M.: GJeOTAR Media; 2012; 177—192. [in Russian]*
23. Суханов Д.С. Фармакотерапия лекарственных поражений печени при туберкулезе (экспериментально-клиническое исследование). Дисс. на соиск. уч. ст. д.м.н. СПб.: 2014; 273. / *Sukhanov D.S. Farmakoterapija lekarstvennykh porazhenij pecheni pri tuberkuleze (jeksperimental'no-klinicheskoe issledovanie). Diss. na soisk. uch. st. d.m.n. SPb.: 2014; 273. [in Russian]*
24. Shin H.-J., Kwon Y.-S. Treatment of drug susceptible pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* (Seoul) 2015; 78: 3: 161—167.
25. Williamson B., Dooley K.E., Zhang Y., Back D.J., Owen A. Induction of influx and efflux transporters and cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes by rifampin, rifabutin, and rifapentine. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 12: 6366—6369.
26. Jarvis B., Lamb H.M. Rifapentine. *Drugs* 1998; 56: 4: 607—616.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Островский Константин Петрович — м.н.с. лаборатории наноразмерных систем доставки ООО «Технология лекарств», Москва

Переверзева Элеонора Рафаиловна — д.б.н., в.н.с. лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Трещалин Иван Дмитриевич — к.м.н., заведующий лабораторией фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Осипова Надежда Сергеевна — н.с. лаборатории наноразмерных систем доставки ООО «Технология лекарств», Москва

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

Возняковская Елена Валентиновна — м.н.с. лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Балабаньян Вадим Юрьевич — д.фарм.н., научный консультант ООО «Технология лекарств», Москва

Максименко Ольга Олеговна — к.х.н., заместитель заведующего лабораторией наноразмерных систем доставки ООО «Технология лекарств», Москва

Гельперина Светлана Эммануиловна — д.х.н., заведующий лабораторией наноразмерных систем доставки ООО «Технология лекарств», Москва

Устойчивость к антибиотикам и молекулярные механизмы резистентности у карбапенем-нечувствительных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в педиатрических ОРИТ г. Москвы

О. А. КРЫЖАНОВСКАЯ¹, А. В. ЛАЗАРЕВА¹, Н. М. АЛЯБЬЕВА¹, Р. Ф. ТЕПАНОВ¹,
О. В. КАРАСЕВА², И. В. ЧЕБОТАРЬ¹, Н. А. МАЯНСКИЙ^{1,3}

¹ Научный центр здоровья детей Минздрава России, Москва

² НИИ детской хирургии и травматологии, Москва

³ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

Antibiotic Resistance and Its Molecular Mechanisms in Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Pediatric ICUs in Moscow

О. А. KRYZHANOVSKAYA¹, А. В. LAZAREVA¹, Н. М. ALYABIEVA¹, Р. Ф. TEPAEV¹,
О. В. KARASEVA², И. В. CHEBOTAR¹, N. A. MAYANSKIY^{1,3}

¹ Scientific Center of Children's Health, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow

² Research Institute of Pediatric Surgery and Traumatology, Moscow

³ I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, Moscow

За период 2012—2014 гг. *K. pneumoniae* была выделена у 41% пациентов педиатрических ОРИТ двух лечебно-профилактических учреждений г. Москвы. К имипенему оказались нечувствительными 25%, к меропенему — 27% штаммов. В исследование были включены 67 штаммов *K. pneumoniae*, 57 из них были нечувствительными к меропенему и/или имипенему (карба — НЧ), 10 — чувствительны к меропенему и имипенему (карба — Ч). Все изученные штаммы оказались нечувствительными к исследованным цефалоспорином III—IV поколений, доля нечувствительных к аминогликозидам штаммов составляла 50—84%, более 90% — к ципрофлоксацину и фосфомицину. Среди карбапенем-нечувствительных изолятов 25% были нечувствительными к тигециклину, только 9% имели МПК > 2 мкг/мл. Распространённость изолятов, устойчивых к колистину, составила 20% среди карба-Ч и 26% среди карба — НЧ. Все 100% карба-Ч изоляты продуцировали *bla*_{CTX-M}, в 60% — в комбинации с *bla*_{TEM}. Наиболее распространённой комбинацией детерминант резистентности для карба-НЧ стало сочетание генов *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} и *bla*OXA-48 — у 68% штаммов.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, устойчивость к антибиотикам, карбапенемазы, OXA-48.

Klebsiella pneumoniae is a significant pathogen associated with hospital infections. Its was isolated in intensive care units (ICU) at two pediatric hospitals in Moscow in 2012—2014 from 41% (387/935) of the patients. The rate of carbapenem-nonsusceptibility (Carba-NS) amounted to 25% for imipenem and 27% for meropenem. For further analyses, 67 isolates were selected, including 57 Carba-NS and 10 Carba-susceptible (Carba-S). Among the isolates, 100% was nonsusceptible to the III—IV generation cephalosporins, 50—84% was resistant to aminoglycosides. The rate of nonsusceptibility to ciprofloxacin and phosphomycin exceeded 90%. All the tested Carba-S *K. pneumoniae* isolates were susceptible to tigecycline, whereas 25% of the Carba-NS isolates was tigecycline-NS. The prevalence of the colistin-NS isolates was the same in Carba-S (20%) and Carba-NS (26%) bacteria. The *bla*_{CTX-M} gene was carried by 100% of the Carba-S isolates, combining with the *bla*_{TEM} gene in 60% of the isolates. In 89% of the Carba-NS isolates the OXA-48 carbapenemase was detected, which was combined with CTX-M and/or TEM in all but 1 isolate. Thus, over the last decade, the rate of Carba-NS among nosocomial *K. pneumoniae* increased and the OXA-48 carbapenemase was shown to be dominating in the mechanism of Carba-NS in the pediatric ICUs in Moscow.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, carbapenemase, OXA-48.

Введение

Грамотрицательные бактерии с множественной устойчивостью к антибиотикам являются

причиной серьёзных инфекций, связанных, прежде всего, с оказанием медицинской помощи, увеличивая заболеваемость и смертность во всем мире [1]. В последнее десятилетие глобальное распространение получили устойчивые к карбапенемам представители семейства Enterobacteriaceae, затрудняя антимикробную терапию, особенно в

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119991 Москва, Ломоносовский проспект, 2, Научный центр здоровья детей

отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [2]. Важным представителем указанного семейства является *Klebsiella pneumoniae*, которая играет заметную роль в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций [3]. Так, в стационарах России доля *K.pneumoniae* среди энтеробактериальных возбудителей достигает 25–50% [4–6].

Традиционно карбапенемы рассматривали как препараты резерва для лечения наиболее тяжёлых инфекций, вызванных грамотрицательными возбудителями с устойчивостью к антибиотикам других групп. Однако в последнее время наблюдается быстрое распространение резистентности к данной группе антимикробных препаратов во многих регионах мира, в том числе и в России [1, 6, 7]. Устойчивость к карбапенемам может быть обусловлена рядом механизмов, однако доминирующей причиной является продукция карбапенемаз. Эта группа ферментов, инактивирующих β -лактамы антибиотиков, включает и сериновые протеазы (например, KPC и OXA-подобные ферменты), а также металло- β -лактамазы, такие как IMP, NDM и VIM [8]. Гены карбапенемаз локализованы на различных подвижных элементах, что определяет их способность к быстрому внутри- и межвидовому распространению [9].

Фенотипическая диагностика резистентности, основанная на оценке задержки роста бактерий при культивировании в присутствии антибиотиков, не всегда позволяет выявить молекулярные механизмы резистентности. С этой целью все шире используют молекулярные методы исследования, которые дают возможность определить наличие генов — детерминант резистентности и получить дополнительную информацию о механизмах формирования устойчивости, что бывает необходимым для оптимизации стратегии антибиотикотерапии и прогнозирования резистентности [10].

Цель настоящей работы — оценка распространённости, характеристика спектра антибиотикорезистентности и определение её молекулярных механизмов у устойчивых к карбапенемам изолятов *K.pneumoniae*, выделенных от пациентов педиатрических ОРИТ в г. Москве.

Материал и методы

Объектами исследования служили штаммы *K.pneumoniae*, выделенные у пациентов ОРИТ (возраст <18 лет) двух лечебно-профилактических учреждений г. Москвы в 2012–2014 гг. Видовую идентификацию проводили при помощи MALDI-TOF-масс-спектрометра Biotyper MicroFlex (Bruker, Германия). Фенотипическое определение чувствительности к антибиотикам проводили на автоматическом анализаторе Vitek 2 Compact (BioMérieux, Франция) и методом Е-тестов (BioMérieux, Франция). На анализаторе Vitek 2 определяли чувствительность к аминогликозидам (амикацину, гентамицину, нетилмицину), цефалоспорином (цефотаксиму, цефтазидиму, цефепиму), фторхинолонам (ципрофлоксацину) и фосфомицину. Метод Е-тестов использовали для определе-

ния минимальной подавляющей концентрации (МПК) имипенема, меропенема, колистина и тигециклина; результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями (breakpoint) EUCAST [11]. При описании результатов тестирования антибиотикорезистентности использовали терминологию «нечувствительные» и «чувствительные» бактерии. Нечувствительными считали штаммы с МПК для слабочувствительных и резистентных категорий, остальные штаммы относили к чувствительным. В отношении устойчивости к карбапенемам штаммы делили на две группы: карбапенемочувствительные (карба-Ч) и карбапенемонечувствительные (карба-НЧ). К группе карба-Ч относили изоляты, для которых значения МПК меропенема и имипенема были в диапазоне чувствительных (≤ 2 мкг/мл). К карба-НЧ относили штаммы с резистентностью или слабой чувствительностью к меропенему и/или имипенему (при МПК > 2 мкг/мл).

Для выявления генов бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) — CTX-M, TEM и карбапенемаз — IMP, KPC, NDM, OXA-48 и VIM использовали ПЦР. Бактериальную ДНК выделяли с помощью наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Для амплификации *bla*_{CTX-M} и *bla*_{TEM} использовали праймеры и протокол детекции, описанные ранее [12]. Выявление генов, кодирующих продукцию карбапенемаз, проводили с помощью наборов «АмплиСенс MDR MBL-FL» (IMP, NDM, VIM), «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (KPC, OXA-48) производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Excel. Для сравнения долей использовали z-критерий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Всего в период 2012–2014 гг. *K.pneumoniae* была выделена у 41% (387/935) пациентов ОРИТ, заняв первое место в структуре распространённости возбудителей. Всего было получено 580 изолятов (у некоторых больных *K.pneumoniae* выделяли из нескольких локусов), из числа которых 78–79% изолятов были протестированы на чувствительность к карбапенемам. К имипенему оказались нечувствительными 25% (117/453), а к меропенему — 27% (124/458) изолятов *K.pneumoniae*.

Для дальнейшего анализа были отобраны 57 карба-НЧ и 10 карба-Ч изолятов *K.pneumoniae*. Спектр устойчивости к антибиотикам и диапазоны МПК исследованных штаммов представлены в табл. 1. Для карба-Ч штаммов чувствительность к меропенему и имипенему являлась критерием отбора в данную категорию, т.е. все изоляты имели МПК ≤ 2 мкг/мл. Все карба-НЧ штаммы имели высокие значения МПК меропенема и имипенема, за исключением 1 изолята, который был чувствителен к имипенему (МПК 1 мкг/мл).

Все изученные штаммы оказались нечувствительны к исследованным цефалоспорином III–IV поколений с МПК для них от 4 до > 64 мкг/мл (см. табл. 1). Доля штаммов, не чувствительных к аминогликозидам, варьировала от 50 до 84%. Более 90% карба-НЧ изолятов были не чувствительны к ципрофлоксацину и фосфомицину, причем распространённость устойчивых изолятов была значимо выше среди карба-НЧ *K.pneumoniae* по сравнению с карба-Ч бактериями (см. табл. 1).

Таблица 1. Устойчивость штаммов *K.pneumoniae* к антибиотикам и диапазон МПК

Антибиотик	*НЧ>, мкг/мл	Карба-Ч, n=10		Карба-НЧ, n=57		p
		доля НЧ, %	диапазон МПК, мкг/мл	доля НЧ, %	диапазон МПК, мкг/мл	
Цефотаксим	2	100	4—>64	100	> 64	1
Цефтазидим	1	100	4—>64	100	4—>64	1
Цефепим	1	100	4—>64	100	8—>64	1
Амикацин	8	50	2—>64	72	2—>64	0,16
Гентамицин	2	60	1—16	84	1—>64	0,08
Нетилмицин	2	70	1—>32	72	1—>32	0,9
Ципрофлоксацин	0,5	60	0,25—4	91	0,25—4	0,008
Фосфомицин	32	60	16—>256	96	16—>256	<0,001
Колистин	2	20	0,5—16	25	0,5—16	0,73
Тигециклин	1	0	0,19—1	25	0,25—6	0,075
Меропенем ^a	2	0	0,016—2	100	4—>32	НТ
Имипенем ^a	2	0	0,25—2	98	4—>32	НТ

Примечание. * — НЧ — пограничные значения МПК; НТ — не тестировали; p — значимость различий при сравнении долей нечувствительных к соответствующему антибиотику карба-Ч и карба-НЧ изолятов. ^a — Разделение на группы карба-Ч и карба-НЧ проводили по признаку нечувствительности к меропенему и/или имипенему.

Наибольшую чувствительность исследованные изоляты проявляли в отношении тигециклина и колистина (полимиксина Е). К тигециклину были чувствительны все карба-Ч изоляты (МПК ≤1 мкг/мл). Среди карба-НЧ бактерий доля нечувствительных не превышала 25% (14/57), причём только для 5 (9%) изолятов определяли МПК >2 мкг/мл, соответствуя критерию резистентных, для остальных МПК составляли 1,5—2 мкг/мл (табл. 1). Распространённость изолятов, резистентных к колистину (МПК >2 мкг/мл), составила 20% (2/10) и 26% (15/57) среди карба-Ч и карба-НЧ соответственно (см. табл. 1).

Затем все изоляты, включая карба-Ч бактерии, были протестированы на наличие генов БЛРС (СТХ-М, ТЕМ), а карба-НЧ изоляты дополнительно исследовали на гены карбапенемаз IMP, KPC, OXA-48, NDM и VIM. Носителями гена БЛРС *bla*_{СТХ-М} были 100% (10/10) карба-Ч изолятов, причём у 6 из них он комбинировался с геном *bla*_{ТЕМ} (табл. 2).

Использованный нами ПЦР-метод не выявил ни у одного штамма *K.pneumoniae* IMP, KPC, NDM и VIM. При этом у 89% (51/57) карба-НЧ изолятов был выявлен ген карбапенемазы *bla*_{OXA-48}, причём только у 1 штамма этот ген присутствовал в качестве единственной детерминанты резистентности, а в остальных случаях он сочетался с генами *bla*_{СТХ-М} и/или *bla*_{ТЕМ} (см. табл. 2). Носителями *bla*_{СТХ-М} были 97% (55/57) карба-НЧ изолятов, ген *bla*_{ТЕМ} встречался у 81% (46/57) карба-НЧ бактерий. Наиболее распространённой комбинацией детерминант резистентности стало сочетание гена карбапенемазы *bla*_{OXA-48} с двумя генами БЛРС *bla*_{СТХ-М} и *bla*_{ТЕМ}, обнаруженное у 68% (39/57) карба-НЧ изолятов (см. табл. 2).

У остальных 6 (11%) карба-НЧ изолятов ни один из исследованных генов карбапенемаз, включая IMP, KPC, NDM, OXA-48 и VIM, выявлен не был, при этом все эти изоляты являлись носителя-

ми комбинации *bla*_{СТХ-М} и *bla*_{ТЕМ}. Три изолята из этой группы имели сниженную чувствительность к меропенему и имипенему (МПК 4—8 мкг/мл), один изолят был чувствителен к имипенему (МПК=1 мкг/мл).

Обсуждение результатов

В своей работе мы исследовали профиль антибиотикорезистентности и механизмы устойчивости у карба-НЧ штаммов *K.pneumoniae*, полученных в двух детских ОРИТ в Москве. Доля клебсиелл, устойчивых к карбапенемам, составила 25—27%, что существенно выше по сравнению с данными исследования МАРАФОН (2011—2012 гг.), которое сообщало о 5% нечувствительных к меропенему нозокомиальных изолятов *K.pneumoniae* [6]. Кроме того, распространённость устойчивых к карбапенемам штаммов *K.pneumoniae*, выделенных в 2004—2012 гг. у педиатрических пациентов в Европе, не превышала 1—3% [1]. Таким образом, наши данные указывают на то, что за последние несколько лет частота устойчивости *K.pneumoniae* к карбапенемам заметно возросла, особенно в детских отделениях ОРИТ.

Основным механизмом устойчивости к карбапенемам стала продукция карбапенемазы OXA-48. Её носителями были около 90% исследованных карба-НЧ штаммов, в подавляющем большинстве — в сочетании с БЛРС СТХ-М и/или ТЕМ. В исследовании МАРАФОН нечувствительность к карбапенемам у *K.pneumoniae* также была обусловлена наличием OXA-48 [6]. Географические особенности распространённости различных механизмов устойчивости к карбапенемам демонстрируют данные, полученные в Санкт-Петербурге в 2011—2013 гг. [7]. Здесь формирование резистентности к карбапенемам у *K.pneumoniae* было обусловлено преимущественно металло-β-лактамазой NDM-1.

Таблица 2. Распространённость генов резистентности и их комбинаций у штаммов *K.pneumoniae* (n=67)

Штаммы	Один ген		Комбинация генов			
	CTX-M	OXA-48	CTX-M+ TEM	TEM+ OXA-48	CTX-M+ OXA-48	CTX-M TEM+ OXA-48
Карба-НЧ, n=57	0	1 (2%)	6 (10%)	1 (2%)	10 (18%)	39 (68%)
Карба-Ч, n=10	4 (40%)	НТ	6 (60%)	НТ	НТ	НТ

Примечание. НТ — не тестировали (ОXA-48 определяли только у карба-НЧ изолятов).

Все изученные нами изоляты *K.pneumoniae* были нечувствительными к цефалоспорином III–IV поколения, большинство изолятов обладали устойчивостью к аминогликозидам, фторхинолонам, фосфомицину. Низкая активность β -лактамов в отношении *K.pneumoniae* отмечается с начала 2000 гг. [5] и обусловлена продукцией β -лактамаз различных типов, включая CTX-M, TEM, SHV, а также их комбинаций [12–14], что подтверждают полученные нами результаты.

Сочетание носительства карбапенемаз и БЛРС формирует фенотип множественной устойчивости к антибиотикам и существенно ограничивает выбор препаратов для эффективного лечения клебсиеллезных инфекций. С учётом весомой доли *K.pneumoniae* (41%) в структуре грамотрицательных возбудителей в ОРИТ, это может потребовать пересмотра стандартных схем антимикробной терапии и включения в них альтернативных антибиотиков, чья активность обычно не нарушается механизмами карбапенеморезистентности [15]. Как показало наше исследование, наибольшую активность в отношении карба-НЧ *K.pneumoniae* проявляли колистин и тигециклин; доля нечувствительных к ним изолятов не превышала 25%, а полностью резистентных к тигециклину клебсиелл (МПК > 8 мкг/мл) не выявили.

С недавнего времени полимиксины (колистин) всё чаще становятся «последней надеждой» для лечения инфекций, связанных с полирезистентными возбудителями, сохраняющими чувствительность к этой группе препаратов [15]. По данным отечественных и международных многоцентровых исследований, доля колистинорезистентных представителей семейства Enterobacteriaceae не превышает 1–5%, в том числе *K.pneumoniae* — 2,4–4,5% [6, 16]. Препарат тигециклин, относящийся к группе тетрациклинов, также показал сравнительно высо-

кую активность в отношении карба-НЧ *K.pneumoniae*, что согласуется с ранее опубликованными данными [1, 6, 7]. К сожалению, опыт использования колистина и тигециклина в педиатрической практике ограничен [1, 15]. Тигециклин не показан для лечения пациентов < 18 лет, хотя может назначаться при отсутствии альтернативных антимикробных препаратов. С учётом его потенциальной эффективности при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными полирезистентными возбудителями, в настоящее время проводятся клинические исследования для оценки фармакокинетики, безопасности и эффективности тигециклина у детей 8–11 лет [1].

Таким образом, в последние годы появились и распространились карба-НЧ *K.pneumoniae*, обладающие множественной лекарственной устойчивостью и сложными сочетаниями молекулярных механизмов резистентности. Циркуляция подобных штаммов резко сужает спектр эффективных антимикробных препаратов, особенно в отделениях ОРИТ, и несёт в себе угрозу дальнейшего распространения антибиотикорезистентности. Это диктует необходимость проведения постоянного мониторинга фенотипических и генотипических свойств возбудителей внутрибольничных инфекций. Полученные результаты будут полезны для планирования и модификации схем эмпирической антимикробной терапии у пациентов педиатрических ОРИТ.

Работа была выполнена в лабораторном отделе ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва.

Источник финансирования: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0064, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0064).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kehl S.C., Dowdzicky M.J. Global assessment of antimicrobial susceptibility among gram-negative organisms collected from pediatric patients between 2004 and 2012: results from the tigecycline evaluation and surveillance trial. *J Clin Microb* 2015; 4: 1286–1293.
2. Van Duin D., Kaye K.S., Neuner E.A., Bonomo R.A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75 (2): 115–120.
3. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11 (3): 297–308.
4. Рябкова Е.Л. Оптимизация антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, в стационарах России.

Диссертация на соискание ученой степени к.м.н. 2006. / *Rjabkova E.L.* Optimizacija antibiotikoterapii nozokomial'nyh infekcij, vyzvannyh *Klebsiella pneumoniae*, v stacionarah Rossii. Dissertacija na soiskanie uchenoj stepeni k.m.n. 2006. [in Russian]

5. Решеда Г. К., Рябкова Е. Л., Кречикова О. И., Сухорукова М. В., Шевченко О. В., Эйдельштейн М. В. и соавт. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2008; 10: 96–112. / *Reshed'ko G. K., Rjabkova E. L., Krechikova O. I., Suhorukova M. V., Shevchenko O. V., Ejdel'shtejn M. V. i soavt.* Rezistentnost' k antibiotikam gramotri-catel'nyh vozбудitelej nozokomial'nyh infekcij v ORIT mnogoprofil'nyh stacionarov Rossii. *Klin mikrobiol antimikrob himioter* 2008; 10: 96–112. [in Russian]

6. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011—2012 гг. Клинико-микробиол. антимикроб. химиотер 2014; 16 (4): 254—265. / *Sukhorukova M.V., Ejdel'shtejn M.V., Skleenova E.Ju., Ivanchik N.V., Timohova A.V., Dehnych A.V. i soavt. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nyh shtammov Enterobacteriaceae v stacionarah Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo jepidemiologicheskogo issledovanija MARAFON v 2011—2012 gg. Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter* 2014; 16 (4): 254—265. [in Russian]
7. Агеев В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С. и др. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 3—4; 10—13. / *Ageev V.A., Partina I.V., Lisicyna E.S. i soavt. Chuvstvitel'nost' gramotricatel'nyh bakterij, producentov karbapenemaz, k antibiotikam razlichnyh grupp. Antibiotiki i khimioter* 2013; 58: 3—4; 10—13. [in Russian]
8. Tzouvelekis L.S., Markogiannakis A., Psychogiou M., Tassios P.T., Daikos G.L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev 2012; 25: 682—707.
9. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54 (3): 969—976.
10. Яковлев С.В., Проценко Д.Н., Шахова Т.В., Суворова М.П., Рамишвили В.Ш., Игнатенко О.В. и др. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? Антибиотики и химиотер 2010; 55: 1: 50—58. / *Jakovlev S.V., Procenko D.N., Shakhova T.V., Suvorova M.P., Ramishvili V.Sh., Ignatenko O.V. i soavt. Antibiotikorezistentnost' v stacionare: kontroliruem li my situaciju? Antibiotiki i khimioter* 2010; 55: 1: 50—58. [in Russian]
11. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_4.0_Breakpoint_table.pdf
12. Edelstein M., Pimkin I., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 3724—3732.
13. Сидоренко С.В., Березин А.Г., Иванов Д.В. Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства Enterobacteriaceae к цефалоспориновым антибиотикам. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 3: 3—13. / *Sidorenko S.V., Berezin A.G., Ivanov D.V. Molekuljarnye mekhanizmy ustojchivosti gramotricatel'nyh bakterij semejstva Enterobacteriaceae k cefalosporinovym antibiotikam. Antibiotiki i khimioter* 2004; 49: 3: 3—13. [in Russian]
14. Прячук С.Д., Фурсова Н.К., Абаев И.В., Ковалев Ю.Н., Шишкова Н.А., Печерских Э.И. и др. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp., выделенных в России в 2003—2007 гг. Антибиотики и химиотер 2010; 55: 9: 3—10. / *Prjanchuk S.D., Fursova N.K., Abaev I.V., Kovalev Ju.N., Shishkova N.A., Pecherskikh Je.I. i soavt. Geneticheskie determinanty ustojchivosti k antibakterial'nym sredstvam v nozokomial'nykh shtammakh Escherichia coli, Klebsiella spp. i Enterobacter spp., vydelennykh v Rossii v 2003—2007 gg. Antibiotiki i khimioter* 2010; 55: 9: 3—10. [in Russian]
15. Hsu A.J., Tamma P.D. Treatment of multidrug-resistant gram-negative infections in children. Clin Infect Dis 2014; 58 (10): 1439—1448.
16. Bradford P.A., Kazmierczak K.M., Biedenbach D.J., Wise M.G., Hackel M., Sahm D.F. Correlation of β -lactamase production and colistin resistance among Enterobacteriaceae isolates from a global surveillance program. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60 (3): 1385—1392.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Крыжановская О. А. — научный сотрудник лаборатории микробиологии, ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Лазарева А. В. — к.м.н., заведующая лабораторией микробиологии, ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Алябьева Н. М. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии, ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Теплов Р. Ф. — д.м.н., заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии, ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Карасева О. В. — д.м.н., заместитель директора по научной работе, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии и реанимации, НИИ детской хирургии и травматологии, Москва

Чеботарь И. В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии, ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Маянский Н. А. — д.м.н., заведующий лабораторным отделом, ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России; Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва

Антибиотикорезистентность бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из организма человека в норме и при патологии

М. В. СЫЧЕВА^{1,2}, О. Л. КАРТАШОВА¹, Н. Е. ЩЕПИТОВА², АЛ. А. САФРОНОВ^{3,4}

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

² Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург

³ Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург

⁴ ГБУЗ Городская клиническая больница № 4, Оренбург

Antibiotic Resistance of Enterococci Isolated from Healthy Humans and Patients with Various Pathologies

М. V. SYCHEVA^{1,2}, O. L. KARTASHOVA², N. E. SHCHERITOVA², AL. A. SAFRONOV^{3,4}

¹ Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Orenburg

² Orenburg State Agrarian University, Orenburg

³ Orenburg State Medical University, Orenburg

⁴ Municipal Clinical Hospital No. 4, Orenburg

Выявлена высокая резистентность энтерококков к применяемым антибактериальным препаратам: тетрациклину, ципрофлоксацину и ампициллину. Наибольшей активностью в отношении клинических изолятов *Enterococcus* spp. характеризуются стрептомицин, гентамицин и ванкомицин; в отношении энтерококков кишечной микрофлоры — стрептомицин и гентамицин. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) показано наличие в изолятах генетических детерминант резистентности к аминогликозидам, гликопептидам и тетрациклину. При сопоставлении данных бактериологического и генетического тестирования выявлены фекальные и клинические изоляты *Enterococcus* spp., имеющие гены резистентности к аминогликозидам и гликопептидам, но не сформировавшие выраженную клиническую устойчивость к данным АБП.

Ключевые слова: *Enterococcus* spp., антибактериальные препараты, антибиотикорезистентность.

High resistance of enterococci to the currently used antibacterials, such as tetracycline, ciprofloxacin and ampicillin was observed. Streptomycin, gentamicin and vancomycin showed the highest activity against the clinical isolates of *Enterococcus* spp. Streptomycin and gentamicin showed the highest activity against the intestinal enterococci. The PCR revealed the presence of the genetic determinants of resistance to aminoglycosides, glycopeptides and tetracycline in the isolates. The comparison of the results of the bacteriological and genetic tests provided detection of fecal and clinical isolates of *Enterococcus* spp. possessing the genes of resistance to aminoglycosides and glycopeptides, still without the finally developed significant clinical resistance to the above antibacterials.

Key words: *Enterococcus* spp., antibacterials, antibiotic resistance.

Введение

Энтерококки различных видов являются естественными обитателями организма человека, в частности кишечника, и в то же время — представителями группы условно-патогенных микроорганизмов, которые, обладая вирулентным потенциалом, могут стать причиной возникновения эндогенных инфекций [1]. Проблема патогенности энтерококков неотделима от их антибиотикорезистентности [2]. Это связано как с наличием природных детерминант патогенности и устойчивости к антибиотикам в одних и тех же носителях генетической информации, так и

с приобретением энтерококками генетических детерминант лекарственной устойчивости с последующим обменом генами, кодирующими антибиотикорезистентность [3].

В связи с этим представляет интерес молекулярно-генетическое исследование антибиотикорезистентности энтерококков кишечника как потенциальных возбудителей эндогенной инфекции, а также клинических изолятов энтерококков для оценки риска формирования резистентности к антибактериальным препаратам.

Данная работа выполнена с целью изучения антибиотикорезистентности на уровне фено- и генотипа штаммов энтерококков как представителей симбиотической микрофлоры кишечника и возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний.

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 460014 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11. Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

Таблица 1. Праймеры, использованные для идентификации энтерококков [4]

Вид энтерококка	Ген	Праймеры	Последовательность 5'-3'	Размер продукта реакции, п.о.
<i>E. faecalis</i>	<i>sodA</i>	FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360
		FL2	TAATGGTGAATCTTGGTTTGG	
<i>E. faecium</i>	<i>sodA</i>	FM1	GAAAAACAATAGAAGAATTAT	215
		FM2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA	
<i>E. durans</i>	<i>sodA</i>	DU1	CCTACTGATATTAAGACAGCG	295
		DU2	TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	
<i>E. casseliflavus</i>	<i>sodA</i>	CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	288
		CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	
<i>E. gallinarum</i>	<i>sodA</i>	GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTCTG	173
		GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	
<i>E. hirae</i>	<i>sodA</i>	H11	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	187
		H12	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG	

Таблица 2. Праймеры, использованные для обнаружения детерминант антибиотикорезистентности энтерококков [6–8]

Характеристика антибиотикорезистентности	Ген	Праймеры	Последовательность 5'-3'	Размер продукта реакции, п.о.
Высокий уровень резистентности к гентамицину	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	Hlra 1	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG	369
		Hlra 2	CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	
Резистентность к аминогликозидам (кроме гентамицина)	<i>aph(3')-IIIa</i>	Hlra 3	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG	523
		Hlra 4	CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	
	<i>ant(4')-Ia</i>	Hlra 5	CAAACCTGCTAAATCGGTAGAAGCC	294
		Hlra 6	GGAAAGTTGACCAGACATTACGAAC	
Резистентность к ванкомицину и тейкопланину	<i>vanA</i>	vanA-FOR	CATGACGTATCGGTAAAATC	885
		vanAB-REV	ACCGGGCAGRGATTGAC	
Резистентность к различным концентрациям ванкомицина	<i>vanB</i>	vanA-FOR	CATGACGTATCGGTAAAATC	885
		vanAB-REV	ACCGGGCAGRGATTGAC	
Резистентность к низким концентрациям ванкомицина	<i>vanC-1</i>	vanC123-FOR	GATGGCWGTATCCAAGGA	467
		vanC1-REV	GTGATCGTGGCGCTG	
	<i>vanC-2/3</i>	vanC123-FOR	GATGGCWGTATCCAAGGA	429
		vanC23-REV	ATCGAAAAAGCCGTCTAC	
Резистентность к тетрациклинам	<i>tetM</i>	tetM1	GGTGAACATCATAGACACGC	401
		tetM2	CTTGTTTCGAGTTCCAATGC	
	<i>tetL</i>	tetL1	TGGTCCTATCTTCTACTCATTC	385
		tetL2	TTCCGATTTCCGGCAGTAC	

Материал и методы

Штаммы и условия культивирования. В исследовании использовано 80 штаммов энтерококков, выделенных из фекалий клинически здоровых лиц при обследовании на дисбиоз кишечника, из них: 44 штамма — *Enterococcus faecalis*, 36 — *E. faecium*. 36 штаммов энтерококков, выделенных из клинического материала, в том числе: 23 штамма — из мочи при инфекции мочевыводящих путей; 4 штамма — из раневого отделяемого (гнойный экссудат); 9 штаммов — из смывов с кожи новорождённых при наличии воспалительных заболеваний урогенитального тракта у рожениц, из них: 32 штамма — *E. faecalis* и 4 — *E. faecium*.

Энтерококки выделяли путём посева исследуемого материала на среду Enterococcusel-Agar (Becton Dickinson, США).

Идентификация энтерококков. Штаммы идентифицировали с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием известных праймеров по видоспецифическим генам, кодирующим синтез супероксиддисмутазы (табл. 1) [4]. Синтез праймеров осуществлен компанией «СИНТОЛ», Москва.

ПЦР проводили с 1 мкл бактериального лизата в термощиклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по следующему протоколу: 1-й цикл — 92°C, 4 мин; 30 циклов: 92°C, 30 с; 55°C, 1 мин; 72°C, 1 мин; последний цикл включал элонгацию в течение 7 мин при 72°C. Продукты амплификации анализировали путём электрофоретического разделения в горизонтальном 1% агарозном геле, окрашенном этидия бромидом. В качестве маркеров использовали GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler

100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определённой массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

Чувствительность энтерококков к антибактериальным препаратам. Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) определяли диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [5]. В работе использовали стандартные диски промышленного производства (ЗАО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Санкт-Петербург), содержащие следующие антибиотики: ванкомицин, ампициллин, тетрациклин, линезолид, ципрофлоксацин, норфлоксацин, стрептомицин, гентамицин.

Обнаружение генов антибиотикорезистентности. Обнаружение генов антибиотикорезистентности осуществляли с помощью ПЦР по стандартной схеме: гены резистентности к аминогликозидам — по S. Vakulenko et al. [6]; гены резистентности к гликопептидам — по R. Patel et al. [7]; гены резистентности к тетрациклинам — по E. De Leener et al. [8]. Использовали праймеры, синтезированные компанией «СИНТОЛ», Москва (табл. 2).

Полученные данные обработаны статистически [9].

Результаты исследования

В ходе исследования антибиотикорезистентности диско-диффузионным методом было установ-

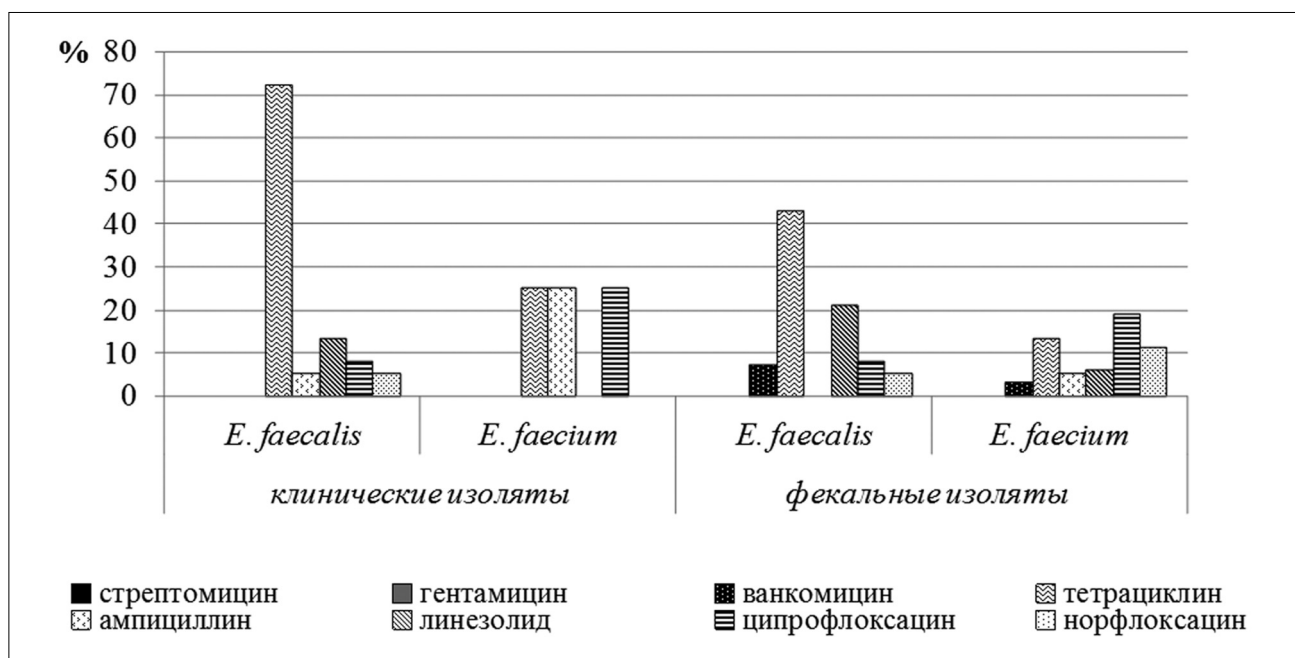


Рис. 1. Частота встречаемости резистентных штаммов среди фекальных и клинических изолятов энтерококков

лено (рис. 1), что штаммы *E. faecalis*, выделенные при патологии, относительно редко и в одинаковом проценте случаев ($3 \pm 2,8\%$) были резистентны к ампициллину и норфлоксацину, в $6 \pm 4,1\%$ — к ципрофлоксацину, в $13 \pm 5,9\%$ случаях — к линезолиду, тогда как доля штаммов, резистентных к тетрациклину, была довольно велика и составляла $72 \pm 7,9\%$.

Среди штаммов *E. faecium* отмечена резистентность к ампициллину, тетрациклину и ципрофлоксацину, уровень резистентности был одинаковым и составлял $25 \pm 21,6\%$.

При изучении антибиотикорезистентности энтерококков, выделенных из фекалий, были получены следующие результаты. Штаммы *E. faecalis* в $7 \pm 3,8\%$ случаев были устойчивы к ванкомицину, в $43 \pm 7,4\%$ — к тетрациклину; в $22 \pm 6,2\%$ — к линезолиду; в $9 \pm 4,3\%$ — к ципрофлоксацину и в $5 \pm 3,2\%$ — к норфлоксацину.

Среди *E. faecium* значительно реже регистрировались штаммы, резистентные к ванкомицину ($3 \pm 2,8\%$), тетрациклину ($14 \pm 5,7\%$), линезолиду ($6 \pm 3,9\%$) и, напротив, в 2,1—3,6 раз чаще — к фторхинолонам (ципрофлоксацину и норфлоксацину — в $19 \pm 6,5\%$ и $11 \pm 5,2\%$ случаев соответственно). Кроме того, среди энтерококков этого вида $6 \pm 3,9\%$ штаммов были резистентны к ампициллину.

Поскольку известно, что на фенотипическом уровне не всегда проявляется информация, закодированная в геноме, мы изучили распространённость среди изученных штаммов энтерококков генов, кодирующих антибиотикорезистентность.

Генетическая характеристика антибиотикорезистентности энтерококков, выделенных при инфекционно-воспалительных заболеваниях, представлена на рис. 2, из которого видно, что ряд изолятов, как среди *E. faecalis*, так и среди *E. faecium*, характеризуются наличием генов резистентности к аминогликозидам, гликопептидам и тетрациклину.

Ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* обнаружен у $91 \pm 5,0\%$ штаммов *E. faecalis*; гены *aph(3')-IIIa* и *ant(4')-Ia* — у $28 \pm 7,9$ и $19 \pm 6,9\%$ штаммов этого вида, соответственно, а также у $50 \pm 25,0\%$ штаммов *E. faecium*.

Ген *vanA* выявлен у $88 \pm 5,7\%$ штаммов *E. faecalis* и у $75 \pm 21,6\%$ штаммов *E. faecium*; ген *vanC-2/3* — только у культур *E. faecalis* в $22 \pm 4,5\%$ случаев; ген *vanC-1* зафиксирован у $9 \pm 5,0\%$ культур *E. faecalis* и у $25 \pm 21,6\%$ *E. faecium*. Штаммов, содержащих ген *vanB*, выявлено не было.

Изучение резистентности к тетрациклинам на генетическом уровне у клинических изолятов позволило обнаружить у культур *E. faecalis* только ген *tetM* ($69 \pm 8,1\%$ изолятов), тогда как у штаммов *E. faecium*, наряду с данным геном, зарегистрирован ген *tetL* ($25 \pm 21,6\%$ и $50 \pm 25,0\%$ изолятов соответственно).

При исследовании фекальных изолятов энтерококков на наличие генов резистентности к аминогликозидам было установлено, что наиболее часто ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* регистрировался у культур *E. faecalis* ($45 \pm 7,5\%$), реже — у культур *E. faecium* ($17 \pm 6,2\%$) ($p < 0,05$), напротив, ген *ant(4')-Ia* чаще выявляли у штаммов *E. faecium* ($20 \pm 6,6\%$), чем у штаммов *E. faecalis* ($4 \pm 2,9\%$) ($p < 0,05$); ген

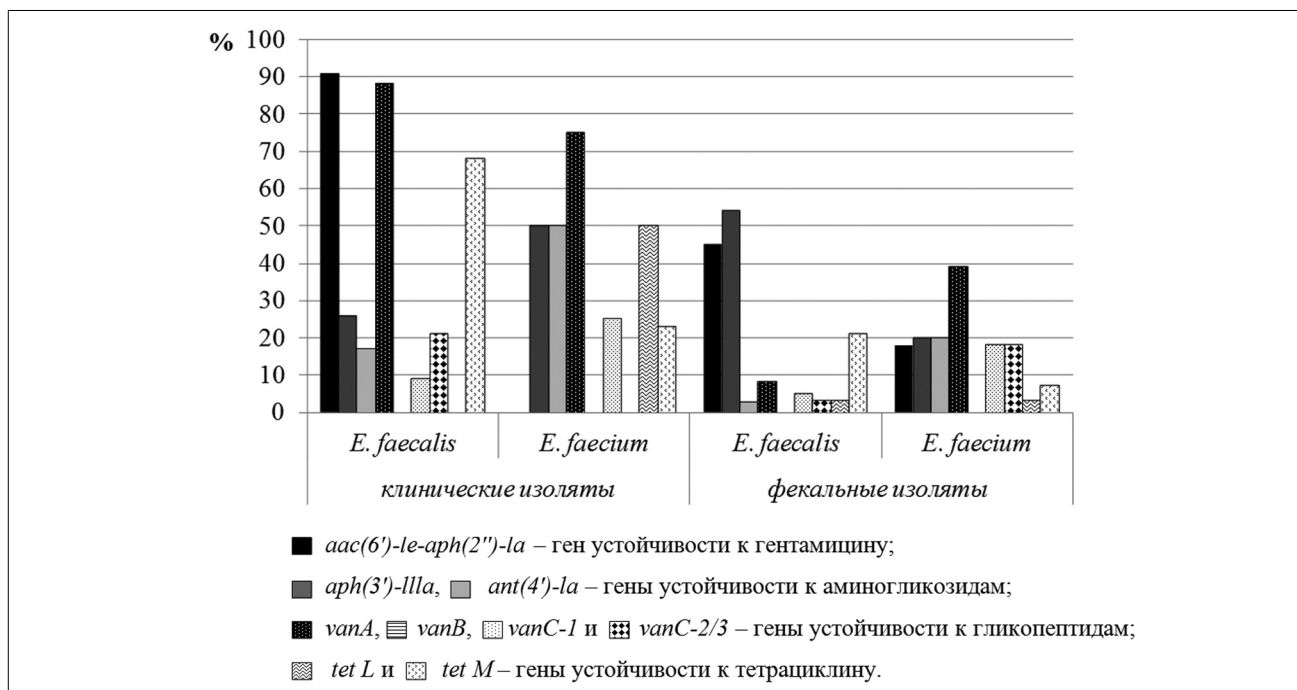


Рис. 2. Генетическая характеристика антибиотикорезистентности фекальных и клинических изолятов энтерококков

Примечание: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* - ген устойчивости к гентамицину; *aph(3')-IIIa* и *ant(4')-Ia* - гены устойчивости к аминогликозидам; *vanA*, *vanB*, *vanC-1* и *vanC-2/3* - гены устойчивости к гликопептидам; *tetL* и *tetM* - гены устойчивости к тетрациклину.

aph(3')-IIIa обнаружен у $55 \pm 7,5\%$ штаммов *E. faecalis* и у $20 \pm 6,6\%$ *E. faecium* ($p < 0,001$).

Гены устойчивости к гликопептидам чаще регистрировали у штаммов *E. faecium*: так, ген *vanA* выявлен у $39 \pm 8,1\%$ изолятов *E. faecium* и у $7 \pm 3,8\%$ культур *E. faecalis* ($p < 0,001$), ген *vanC-1* у $17 \pm 6,2\%$ культур *E. faecium* и у $5 \pm 3,2\%$ *E. faecalis* ($p < 0,05$), ген *vanC-2/3* — у $17 \pm 6,2\%$ штаммов *E. faecium* и у $4 \pm 2,9\%$ *E. faecalis*.

Ген резистентности к различным концентрациям ванкомицина (*vanB*) у фекальных штаммов не выявлен.

Ген *tetM* был обнаружен у $21 \pm 6,1\%$ штаммов *E. faecalis* и у $7 \pm 4,2\%$ штаммов *E. faecium* ($p < 0,05$), выделенных из фекалий, ген *tetL* — выявлен у культур *E. faecalis* и *E. faecium* в $5 \pm 3,2$ и $3 \pm 2,8\%$ случаев соответственно.

Таким образом, в ходе исследования антибиотикорезистентности энтерококков, выделенных из разных источников, было установлено, что данной способностью характеризовались $72 \pm 7,4\%$ штаммов из патологического материала и $51 \pm 5,5\%$ фекальных изолятов, у которых обнаружена резистентность к тому или иному классу антибактериальных препаратов. Однако, у ряда фекальных изолятов обоих видов, в отличие от клинических, отмечена резистентность к ванкомицину, кроме того, штаммы *E. faecium* характеризовались резистентностью к линезолиду и

норфлоксацину, тогда как среди клинических изолятов такие штаммы отсутствовали.

Установлено, что антибиотикорезистентные штаммы чаще встречались среди *E. faecalis* ($30 \pm 5,2\%$), чем среди *E. faecium* ($15 \pm 5,5\%$) ($p < 0,05$). Отмечена высокая устойчивость *E. faecalis*, выделенных из разных источников, к тетрациклину, а также *E. faecium*, выделенных из патологического материала, к тетрациклину, ампициллину и ципрофлоксацину. Вместе с тем, у штаммов *E. faecium*, выделенных из фекалий, спектр резистентности к изученным антибактериальным препаратам оказался более широким по сравнению с изолятами из клинического материала.

Все изученные энтерококки обладали чувствительностью к аминогликозидам, а штаммы, выделенные из клинического материала, ещё и к гликопептидам. Необходимо отметить, что результаты определения чувствительности к гентамицину, стрептомицину и ванкомицину, полученные в ходе нашего исследования, несколько отличались от данных зарубежных и отечественных авторов [10—12]. Однако проведённое молекулярно-генетическое исследование антибиотикорезистентности выявило наличие у большинства клинических изолятов *E. faecalis* генов устойчивости к аминогликозидам и гликопептидам. В меньшем проценте случаев гены резистентности к антимикробным препаратам регистрировались у штаммов, выделенных из фека-

лий (исключение — ген *aph(3')*-IIIa у *E.faecalis*). Методом корреляционного анализа у исследуемых штаммов энтерококков, изолированных из клинического материала и кишечного биотопа, обнаружена обратная взаимосвязь ($r=-0,938$ ($p<0,001$) и $r=-0,701$ ($p<0,001$) соответственно) между наличием в геноме генетических детерминант резистентности к аминогликозидам и фенотипическим проявлением признака. Выявленная закономерность может быть связана с тем, что данные препараты в последнее время редко используются в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний энтерококковой этиологии, в связи с этим не возникает селективного давления антибиотиков, способствующего фенотипическому проявлению признака антибиотикорезистентности. Для изученных клинических изолятов *Enterococcus* spp. также было характерно наличие генетических детерминант резистентности к гликопептидам при отсутствии их экспрессии ($r=-0,938$ ($p<0,001$)).

Полученные нами сведения о высокой резистентности энтерококков к тетрациклину и наличие у них генов устойчивости подтверждают данные литературы [13, 14] и свидетельствуют о том, что тетрациклины не должны использоваться для терапии энтерококковых инфекций. Корреляционный анализ антибиотикорезистентности клинических и фекальных культур энтерококков к тетрациклину на уровне фено- и генотипа выявил наличие высокодостоверной связи между наличием генов резистентности и фенотипическим проявлением этого признака ($p<0,001$).

Средством выбора для терапии энтерококковых инфекций, обусловленных устойчивыми к ванкомицину штаммами, считается линезолид. По нашим данным, чувствительность энтерококков к этому антибактериальному препарату составляет 95–100% для *E.faecium* и 80–88% для *E.faecalis*. В целом, полученные результаты сравнимы с имеющимися в литературе: резистентность энтерококков к линезолиду практически отсутствует, составляя не более 0,7–7,9% [15–17], хотя в нашем исследовании процент резистентных к линезолиду культур был несколько выше.

Нами установлена высокая резистентность к ампициллину у изолятов *E.faecium* по сравнению с *E.faecalis*, что отмечено и другими авторами, в ча-

стности [18]. Данный факт объясняется способностью *E.faecium* продуцировать дополнительный пенициллинсвязывающий белок — ПСБ-5, обладающий низкой аффинностью к β -лактамам антибиотикам [19].

В качестве альтернативных препаратов для терапии энтерококковых инфекций ранее рассматривались фторхинолоны [10], однако в настоящее время сообщается об их умеренной активности [20]. В нашем исследовании была оценена чувствительность энтерококков к норфлоксацину и ципрофлоксацину и показано, что первый обладал наибольшей активностью, тогда как ципрофлоксацин был достаточно активен в отношении *E.faecalis* ($93\pm 4,5\%$ чувствительных штаммов) и в меньшей степени ($50\pm 20,4\%$ штаммов) — в отношении *E.faecium*.

Выводы

1. В популяции фекальных изолятов энтерококков обнаружен более низкий процент резистентных штаммов к различным антимикробным препаратам, чем среди клинических изолятов *Enterococcus* spp. Исключение составили фторхинолоны: на фенотипическом уровне процент резистентных к норфлоксацину был меньше среди клинических изолятов.

2. Анализ генетических детерминант резистентности среди бактерий рода *Enterococcus* показал широкую распространённость генов резистентности к аминогликозидам, тетрациклинам и гликопептидам, с максимальной частотой встречаемости у изолятов, выделенных от больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями.

3. Максимальную чувствительность как фекальные, так и клинические изоляты *Enterococcus* spp., проявляли к стрептомицину и гентамицину. Однако, принимая во внимание наличие в геноме генетических детерминант резистентности к аминогликозидам и возможность активизации скрытых генетических механизмов, целесообразность применения аминогликозидов в качестве резервной терапии является сомнительной.

4. Среди исследованных антибиотиков клинически значимой активностью в отношении культур *Enterococcus* spp. характеризовался линезолид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вальшева И.В. Генетическая характеристика вирулентного потенциала энтерококков кишечной микробиоты человека. Журн микробиол эпидемиол иммунобиол 2012; 4: 44–47. / Valysheva I.V. Geneticheskaja harakteristika virulentnogo potenciala jenterokokkov kishhechnoj mikrobioty cheloveka. Zhurn mikrobiol jepidemiol immuno-biol 2012; 4: 44–47. [in Russian]
2. Mundy L.M., Sahm D.F., Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 13; 4: 513–522.
3. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Биология и экология энтерококков. Екатеринбург: УрО РАН, 2012; 227. / Buharin O.V., Valyshev A.V. Biologija i jekologija jenterokokkov. Ekaterinburg: UrO RAN, 2012; 227. [in Russian]
4. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microbiol 2004; 42; 8: 3558–3565.
5. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Минздрав России, 2005; 62. / МУК 4.2.1890-04 Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. M.: Minzdrav Rossii, 2005; 62. [in Russian]
6. Vakulenko S., Donabedian S.M., Voskresenskiy A.M. et al. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. Antimicrob Agents and Chemother 2003; 47; 4: 1423–1426.

7. Patel R., Uhl J. R., Kohner P., Hopkins M.K., Cockerill F.R. Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and van C-2/3 genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35; 3: 703-707.
8. De Leener E., Martel A., Decostere A. et al. Distribution of the erm(B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist* 2004; 10: 341-345.
9. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит, 1962; 180. / *Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh. L.: Gos. izd-vo med. lit, 1962; 180. [in Russian]*
10. Дехнич А.В., Кречикова О.И., Туркова Л.И., Страчунский Л.С. Энтерококковое носительство и антибиотикорезистентность в отделении выхаживания недоношенных новорождённых. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2001; 1; 3: 28—38. / *Dehnic A.V., Krechikova O.I., Turkova L.I., Strachunskij L.S. Jenterokokkovoe nositel'stvo i antibiotikorezistentnost' v otdelenii vyhazhivaniya nedonoshennyh novorozhdennyh. Klin mikrobiol antimikrob himioter* 2001; 1; 3: 28—38. [in Russian]
11. Heidari H., Emameini M., Dabiri H. et al. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of enterococcal strains isolated from burn patients. *Microb Pathog* 2016; 90: P. 93—97.
12. Banerjee T., Anupurba S.J. Prevalence of virulence factors and drug resistance in clinical isolates of enterococci: a study from North India. *Pathog* 2015; doi: 10.1155/2015/692612. Epub 2015 Aug 23.
13. Ben Sallem R., Klibi N., Klibi A. et al. Antibiotic resistance and virulence of enterococci isolates from healthy humans in Tunisia. *Annals of Microbiology* 2015; Article in press.
14. Abamecha A., Wondafrash B., Abdissa A. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia *Microbiology. BMC Research Notes* 2015; doi: 10.1186/s13104-015-1200-2.
15. Bhatt P., Patel A., Sahni A.K. et al. Emergence of multidrug resistant enterococci at a tertiary care centre. *Med J Armed Forces* 2015; 71; 2: 139—144.
16. Huang Y.C., Xie Y., Chen Z.X. et al. Bloodstream infections in south-western China: 2012 Whire Union report on bacterial susceptibility to antibiotics. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2015; 46; 1: 75—81.
17. Flamm R.K., Mendes R.E., Hogan P.A. et al. Linezolid surveillance results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014). *Antimicrob Agents Chemother* 2016; pii: AAC.02803-15 [Epub ahead of print].
18. Noor Shafina M.N., Nor Azizah A., Mohammad A.R. et al. Bacterial pathogens and antibiotic resistance patterns in children with urinary tract infection in a Malaysian tertiary hospital. *Med J Malaysia* 2015; 70; 3: 153—157.
19. Zhou C., Niu H., Yu H. Effects of two novel amino acid substitutions on the penicillin binding properties of the PBP5 C terminal from *Enterococcus faecium*. *Mol Med Rep* 2015; doi: 10.3892/mmr.2015.4057.
20. Белов Б.С., Сидоренко С.В., Соболева М.К., Медынцева Л.Г. Современный инфекционный эндокардит у детей и подростков. *РМЖ* 2012; 33: 1596. / *Belov B.S., Sidorenko S.V., Soboleva M.K., Medynceva L.G. Sovremennyy infekcionnyj jendokardit u detej i podrostkov. RMZh* 2012; 33: 1596. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сычева Мария Викторовна — к.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней, Оренбургский государственный аграрный университет, старший научный сотрудник лаборатории по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

Карташова Ольга Львовна — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

Щепитова Наталья Евгеньевна — заведующая лабораторией молекулярно-генетических и бактериологических исследований кафедры микробиологии и заразных болезней, Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург

Сафронов Александр Андреевич — к.м.н., травматолог, ГБУЗ Городская клиническая больница № 4 города Оренбурга, доцент кафедры травматологии и ортопедии, Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург

Стрептомицеты в свете концепции «многоклеточности» бактерий

К. А. ВИНОГРАДОВА, В. Г. БУЛГАКОВА, А. Н. ПОЛИН

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

Streptomycetes in the Light of the Concept of Multicellularity of Bacteria

K. A. VINOGRADOVA, V. G. BULGAKOVA, A. N. POLIN

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

В обзоре обсуждаются некоторые аспекты роста и развития стрептомицетов, имеющие приспособительное значение для их существования в природных условиях и отражающие представление о них как о прокариотах, определенно обладающих рядом признаков, свойственных многоклеточному организму. В качестве полезной модели, дающей уникальные возможности для исследования разных аспектов биологии стрептомицетов как на лабораторных средах, так и в природе *in situ*, нами представлен *Streptomyces olivocinereus* — продуцент люминесцирующего антибиотика гелиомицина (резистомицина). В нашем сообщении суммированы результаты многолетнего изучения роста, дифференциации и «поведения» этого продуцента, проведенные группой исследователей Московского государственного университета. Полученные данные могут быть привлечены в числе аргументов в пользу «многоклеточной» природы стрептомицетов.

Ключевые слова: стрептомицеты, концепция многоклеточности.

The review concerns discussion of certain aspects of growth and development of streptomycetes, that have an adaptation meaning for their existence under natural conditions and reflect our perception of them as procaryotes which have a range of qualities typical of multicellular organisms. At present, the concept of multicellularity is the key idea in investigation of growth processes, differentiation and physiology of streptomycetes. *Streptomyces olivocinereus* is presented as an effective model that gives the unique opportunities for investigation of different aspects of biology of streptomycetes within laboratory environment as well as in natural environment *in situ*. *S. olivocinereus* produces luminescent antibiotic geliomycin (resistomycin). In this review we summarized the results of the many years of investigation of growth, differentiation and behavior of this streptomycete. The investigations were undertaken by a group of scientists of the Moscow State University. The results can be employed as arguments for the multicellular nature of streptomycetes.

Key words: streptomycetes, growth and differentiation, concept of multicellularity.

Стрептомицеты — мицелиальные бактерии, повсеместно встречающиеся в природе, являются неотъемлемыми участниками жизни биосферы. Участвуя в разнообразных геохимических процессах, они способны модифицировать множество соединений — и природных, и ксенобиотиков, оказывая глубокое воздействие на окружающую среду и изменяя её, часто необратимо, экосистемы, в которых они существуют. В разных отраслях практической деятельности человека давно и с большим успехом используется уникальная способность стрептомицетов как группы в целом к синтезу огромного множества разнообразных биологически активных веществ. Общеизвестно, что эти вещества имеют очень большое значение для клинической медицины, микробиологической промышленности, сельского хозяйства, аквакультуры и других отраслей народного хозяйства.

К настоящему времени в силу многих причин [1, 2] активный интерес к стрептомицетам как к неисчерпаемому, повидимому, источнику разнообразных природных биологически активных веществ возник вновь, порождая распространённый (и закономерный) вопрос: почему стрептомицеты обладают способностью продуцировать так много таких веществ? Есть мнение, что химическое разнообразие биологически активных соединений, продуцируемых стрептомицетами, возникло как результат их взаимоотношений в природе с множеством других разнообразных организмов [3]. Известно также, что уникальное обилие и разнообразие продуцируемых стрептомицетами молекул определяется сложностью программы их индивидуального развития [4]. С другой стороны, при переходе стрептомицетов к существованию в виде биоплёнок также происходит значительное изменение их биосинтетических возможностей [5]. Ещё в начале становления актиномицетологии известным отечественным исследователем А. А. Прокофье-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: E-mail: ksevinogradova@yandex.ru

вой-Бельговской [6] было указано на наличие у стрептомицетов определённых черт, присущих многоклеточным организмам. К настоящему времени накопленный массив данных об этой группе прокариотов привёл к заключению, что поведение стрептомицетов скорее напоминает поведение сложного многоклеточного организма, жизненный цикл которого выполняется под контролем сигнальных механизмов [4]. Концепция многоклеточности стрептомицетов в настоящее время становится ключевой идеей при исследовании процессов роста и дифференциации стрептомицетов и их физиологии. В свою очередь знание фундаментальных закономерностей процессов развития стрептомицетов, их физиологии и экологии остаётся основой для организации рациональных поисков продуцентов новых метаболитов, как и основой для оптимизации промышленного получения практически значимых веществ для медицины и других отраслей.

В данном кратком обзоре обсуждаются некоторые аспекты роста и развития стрептомицетов, имеющие приспособительное значение для их существования в природных условиях и отражающие представление о них как о прокариотах, определённо обладающих рядом признаков, свойственных многоклеточному организму. В качестве полезной модели, дающей уникальные возможности для исследования разных аспектов биологии стрептомицетов как на лабораторных средах, так и в природе *in situ*, нами представлен *Streptomyces olivocinereus* — продуцент люминесцирующего антибиотика гелиомицина (резистомицина). В нашем сообщении суммированы результаты многолетнего изучения роста, дифференциации и «поведения» этого продуцента, проведённые группой исследователей Московского государственного университета. Полученные данные могут быть привлечены в числе аргументов в пользу «многоклеточной» природы стрептомицетов.

Ключевые события роста и развития стрептомицетов и их экологическое значение

Известно, что стрептомицеты (грамположительные мицелиальные бактерии *Actinobacteria*, порядок *Actinomycetales*, семейство *Streptomycetaceae*) могут существовать либо как колонии — многоклеточные структуры со сложной морфологической и физиологической дифференциацией, либо в составе биоплёнок — также структурированных многоклеточных образований.

Процессы роста и дифференциации колоний стрептомицетов, молекулярно-генетические механизмы их морфогенеза, регуляторные сети и внутриклеточные и внеклеточные сигналы, кон-

тролирующие скоординированное развитие отдельных групп клеток в составе колонии, являются предметом интенсивного изучения на протяжении нескольких десятилетий. По различным аспектам этой проблемы опубликованы обширные обзоры, на которые мы опираемся при обсуждении данной темы [6—10]. Как базовое давно сформировалось представление о том, что синтез вторичных метаболитов и, в первую очередь, синтез антибиотиков, связан с процессами роста и морфогенеза стрептомицетов [11].

Фундаментальная концепция о том, что образование стрептомицетами уникального разнообразия вторичных метаболитов скоординировано с программой их роста и развития, опирается на данные молекулярной биологии и генетики, на исследования сигнальных механизмов и генных регуляторных сетей, которые управляют сложной программой роста и дифференциации этих мицелиальных бактерий.

Идея о том, что бактерии, организовываясь в сложные многоклеточные структуры и приспосабливаясь к образу жизни, альтернативному по отношению к существованию в виде одиночных «планктонных» клеток, демонстрируют признаки, свойственные многоклеточному организму, окончательно оформилась примерно в 90-е годы прошлого века. В настоящее время эта проблема получает поддержку в новых исследованиях морфогенеза и физиологии бактерий и активно дискутируется, смыкаясь с фундаментальной проблемой возникновения многоклеточности в эволюции живых организмов [12—18].

Бактерии предлагается рассматривать как идеальные простые модельные системы для исследования разных аспектов такого сложного и важнейшего эволюционного явления как многоклеточность [9, 18]. Указывается, что бактерии, и в особенности, стрептомицеты как прокариоты, характеризующиеся сложным циклом развития, можно использовать в качестве идеальных простых модельных систем для исследования разных аспектов такого сложного и важнейшего эволюционного явления как многоклеточность [9, 18]. Считается, что на бактериальных моделях можно исследовать вопросы о том, какие эволюционные факторы способствуют переходу организма к многоклеточному образу жизни, какие генетические механизмы в этом участвуют, и почему данный специфический скачок (от одиночных клеток к многоклеточному организму) неоднократно повторялся в эволюционной истории разных групп организмов [18].

Различные формы «многоклеточности», описанные в разных группах бактерий как разные пути «решения» бактериями проблемы «многоклеточности», представлены в обзорах [9, 14—18]. В этом контексте стрептомицеты являются одним

из наиболее совершенных примеров «решения» проблемы.

Стрептомицеты растут и развиваются по сложной программе, включающей процессы мицелиального роста, скоординированные события морфологической и физиологической дифференциации мультигеномных гиф и межклеточные коммуникации. Аргументами в пользу «многоклеточности» стрептомицетов являются: морфологическая и физиологическая дифференцированность формируемых ими колоний, необратимость этой дифференциации, осуществление разных физиологических функций отдельными группами клеток («разделение труда») в составе колонии, наличие программируемой клеточной смерти как закономерной части цикла нормального развития, «поведение» колонии, целостность её реакции в ответ на вызовы окружающей среды.

Давно было обращено внимание на то, что формирование такого сложного образования, как колония стрептомицетов начинается с процесса прорастания одной споры — одной или несколькими трубками прорастания [6]. Рост стрептомицетов, как и рост других мицелиальных организмов — грибов, подчиняется линейной зависимости. Гифы стрептомицетов увеличиваются в длину с постоянной скоростью, удлинение происходит в апикальной области [19]. Апикальный клеточный рост (поляризованный рост, происходящий посредством удлинения клетки в одном направлении) — специфическая и очень важная стратегия морфогенеза стрептомицетов. Апикальное удлинение гиф с их последующим ветвлением в результате появления новых точек роста формирует более или менее разветвленную, более или менее плотную сеть гиф — мицелий [6, 15].

Регуляторные механизмы, контролирующие клеточный рост стрептомицетов, а также механизмы, контролирующие процесс ветвления гиф во времени и пространстве, представлены в обзорах и исследованиях недавнего времени [4, 8, 10, 20—24].

Апикальный характер роста клетки подразумевает, что вся «машинерия» для экспорта строительных блоков для клеточной стенки и само её построение сосредоточено на одном полюсе клетки, являющимся точкой роста гифы. Детерминантой полярности клетки, ключевым белком, обуславливающим состояние ее полярности, контролирующим апикальный рост и ветвление гиф стрептомицетов, является белок DivIVA, входящий в состав апикального мультибелкового полярисомоподобного комплекса. Этот белок локализуется в верхушечной области клетки и в местах появления новых ветвей мицелия. Ему отводится роль маркера, «помечающего» место образования новой ветви и организующего в этом месте все компоненты биосинтеза

клеточной стенки, необходимые для появления новой ветви [20, 21].

Образованию новых ветвей предшествует расщепление «главной» полярисомы, расположенной на верхушке гифы, с образованием дочерних полярисом, в местах локализации которых и будут появляться новые ветви мицелия. В поляризованный рост гиф вовлечена серинтреонинпротеинкиназа эукариотического типа, контролирующая полярисомный комплекс. AfcK фосфорилирует DivIVA, модулируя апикальный рост и ветвление гиф [21]. Это является лишь одним из примеров способности стрептомицетов продуцировать эукариотические индукторы клеточной дифференциации, в том числе и серинтреонинпротеинкиназы, вовлечённые также и в их морфогенез [25]. Неспорообразующие гифы синцитиального субстратного мицелия разделены на многоядерные участки (компарменты) перегородками, имеющими каналы, служащие, как предполагается, для продвижения питательных веществ и плазмид по длине гиф [17]. В структуре зрелой колонии есть мёртвые гифы субстратного мицелия, по которым, как по сосудам растений, предположительно могут транспортироваться вода и растворимые питательные вещества из субстрата в воздушный мицелий [14].

Считается, что характер роста стрептомицетов может быть одним из факторов, делающих эти мицелиальные бактерии столь экологически успешными в освоении мест обитания. Удлинение гиф верхушечной областью, сопровождаемое их ветвлением, обеспечивает стрептомицетам возможность максимально захватывать и осваивать жизненное пространство по разным направлениям при поиске ресурсов питания. Это особенно эффективно, в частности, в почве с её, как правило, дискретно локализованными ресурсами. Хрестоматийным также является утверждение, что рост организма в виде мицелия имеет определённое экологическое преимущество перед ростом в виде одиночных клеток в случае встречи с клетками хищника. На примере *Mycobacterium tuberculosis* показано, что при переходе к росту в виде нитчатых форм возникает повышенная устойчивость клеток к поглощению их макрофагами по сравнению с одиночными клетками, то есть переход к мицелиальной форме — адаптивный ответ, приводящий к увеличению выживаемости в условиях экзогенного стресса [17].

Ключевым моментом освоения новых экологических ниш стрептомицетами является образование репродуктивного воздушного мицелия. Это событие описывается как решающий этап морфогенеза, имеющий важнейшее экологическое значение. Гифы воздушного мицелия, преодолевая поверхностное натяжение, покидают насыщенную влагой среду — водное окру-

жение, в котором живёт субстратный мицелий, и растут вверх от поверхности колонии, в воздушную среду [4]. Подчёркивается, что образование воздушного мицелия происходит как скоординированное поведение большого числа клеток на поверхности колонии [8]. Формирование воздушных структур стрептомицетов — сложный многоступенчатый процесс. Этот этап морфогенеза, ключевые гены, его контролируемые, скоординированные сигнальные пути, регулирующие спорогенез, представлены в обзорах [4, 8, 15, 26–29].

Рост воздушных гиф вверх обусловлен образованием морфогенетических сурфактантных внеклеточных белков. Они снижают поверхностное натяжение воды на поверхности колонии, формируют гидрофобную поверхностную оболочку воздушных гиф и зрелых спор, давая тем самым возможность воздушным гифам преодолеть поверхностное натяжение на разделе воздух–вода, направляя их рост вверх от субстрата в воздушную среду — «reach for the sky!» [26, 27].

Описаны три семейства сурфактантных белков, играющих ключевую роль в морфогенезе воздушных структур стрептомицетов: SapB, семейство chaplins и семейство rodlines [27]. В условиях *in vitro* SapB и chaplins как поверхностноактивные вещества снижают поверхностное натяжение на разделе поверхностей воздух–вода примерно в три раза, причём белки chaplins обладают большей активностью [26, 30].

Первым был выделен сурфактантный белок SapB, изучена его структура, идентифицированы гены, ответственные за его синтез, показана его определяющая роль в иницировании процесса образования воздушного мицелия *S.coelicolor*. Белок структурно и биосинтетически относится к лантибиотикам — многочисленному классу веществ, синтезируемых стрептомицетами, но не обладающих антибиотической активностью. Образование воздушного мицелия у *S.coelicolor* контролируется регуляторными *bld* генами, *bld* мутанты не формируют воздушный мицелий и не продуцируют SapB. Совместное выращивание штамма дикого типа и *bld* мутантов компенсирует у последних отсутствие SapB и восстанавливает способность к образованию воздушного мицелия [27].

Эта экстрацеллюлярная комплементация рассматривается как пример экстраклеточного сигналинга [8]. Однако при воздействии белка SapB на *bld* мутанты имеет место только подъём субстратных гиф, но при этом не формируется морфологически типичный воздушный мицелий [27]. SapB не образуется на бедных питательных средах, являясь фактором дифференциации только на богатых средах [4].

Образование воздушного мицелия *S.coelicolor* происходит по двум разным путям: один (SapB-

зависимый) осуществляется только на богатых средах, а второй (SapB-независимый) и на богатых, и на бедных средах, последний обусловлен белками chaplins, являющимися главными компонентами гидрофобной оболочки воздушных структур стрептомицетов. Образование оболочки также необходимо для того, чтобы воздушный мицелий, приобретая способность покинуть водную среду, мог бы расти вверх, в воздушную среду [26]. Нормальное образование воздушных гиф сильно нарушается, когда все восемь генов, контролирующих семейство белков chaplins, отсутствуют [27]. Эти белки, в отличие от SapB, образуются и на богатых, и на бедных питательных средах. Это обеспечивает стрептомицетам возможность для распространения даже в условиях лимитирования ресурсов питания, столь обычных в природе.

Было показано, что белки chaplins являются также структурными компонентами амилоидных фимбрий, которые вовлечены в прикрепление гиф стрептомицетов к гидрофобной поверхности субстрата [31].

Роль белков rodlines состоит в организации белков chaplins в виде слоя палочковидных структур на поверхности воздушных структур. Рисунок поверхности оболочки спор имеет статус таксономического признака. У стрептомицетов, которые не образуют белки rodlines, поверхность оболочки спор гладкая. Предполагают, что поверхностный слой оболочки спор ответственен за устойчивость спор к действию протеаз, а также способствует распространению спор ветром или насекомыми [26, 27]. Кроме того, принимается во внимание возможность транспортировки, диффузии по поверхностной оболочке воздушных гиф питательных веществ и определённых метаболитов, перемещающихся таким образом из нижних областей колонии вверх, к растущим верхушкам воздушных гиф [29].

Центральную роль в образовании воздушных структур *S.coelicolor* играет иерархический регуляторный *bld* каскад [27]. Делеция этого кластера генов приводит к утрате способности образовывать воздушный мицелий. BldD контролирует большинство генов, вовлечённых в развитие стрептомицетов, а его активность контролируется сигнальной молекулой CDG (cyclic-di-GMP), этот важнейший процесс освещён в недавнем обзоре [28]. Открыт кластер регуляторных генов *whi*, ответственных за типичную серую окраску спор. Описан кластер *gam* генов («rapid aerial mycelium»), ответственный за образование пептида SapB [4]. Экспрессия *chr* генов требуется для образования поверхностноактивных гидрофобных белков chaplins, ответственных за изменение направления роста [27].

В интегрированном управлении образованием воздушных структур участвуют и межклеточный сигналинг, и экстрацеллюлярные протеазы, и другие ферменты, а также физиологическое состояние культуры, характер источника углерода в среде, баланс ресурсов питания и энергии, факторы стресса. Важное место занимает также общепринятая ранняя концепция о влиянии истощения питательных веществ на дифференциацию стрептомицетов [4, 8, 32]. Одна из экспериментальных работ свидетельствует о явлении хищничества как о сигнале из внешней среды, инициирующем и морфогенез, и биосинтез антибиотика у стрептомицета-жертвы [33].

У *S.griseus* образование воздушного мицелия контролируется каскадом сигналов, из которых ключевым является гормоноподобная молекула γ -бутиролактон — А-фактор. Сигнальные пути, инициирующие образование воздушного мицелия у данного вида, хорошо изучены, и этот процесс скоординирован с вторичным метаболизмом, в частности, с биосинтезом стрептомицина [4, 34].

После того, как образуются гифы воздушного мицелия, программа развития переключается, и происходит септация гиф с образованием одноядерных (гаплоидных) спор. Образование спор рассматривается как кульминация всего морфогенетического процесса, имеющего безусловное жизненно важное приспособительное значение. Посредством распространения спор стрептомицеты продвигаются в новые экологические ниши, осваивая новые места обитания [15].

Массовое деление гиф и сегрегация хромосом, приводящие к образованию цепочек гаплоидных спор, являются высокоскоординированным процессом, с почти одновременным образованием множества клеточных перегородок по длине воздушной гифы. Высокая пространственная и временная синхронность клеточного деления при спорообразовании у стрептомицетов рассматривается как важнейшее их «продвижение по пути к многоклеточности» [17].

Спорообразование происходит в апикальном участке спорообразующей гифы, отделённом от базального её участка перегородкой, выделяющей, таким образом, компартмент, где происходит экспрессия генов, контролирующих спорообразование [8]. Молекулярный механизм образования клеточных перегородок при спорообразовании у стрептомицетов и подробности этого процесса описаны в обзорах [4, 10, 17, 29, 35].

Подчёркивается, что процесс клеточного деления воздушных репродуктивных гиф при спорообразовании у стрептомицетов принципиально отличается от образования перегородок в синтициальном неспорообразующем мицелии с его нечастыми и нерегулярно расположенными перегородками. Утверждается, что, в отличие от

одноклеточных бактерий, клеточное деление стрептомицетов имеет другую специфику в их жизненном цикле — оно имеет признаки несущественного события для вегетативного роста, будучи преимущественно задействованным в процессе деления воздушных гиф при спорообразовании [8].

Семейство уникальных белков — SsgA-подобные белки или SALPs относятся к специфическим регуляторным белкам развития стрептомицетов, контролирующим в том числе и их клеточное деление [35]. SsgA локализуется в гифах в местах формирования новых клеточных стенок в вегетативном и репродуктивном мицелии — в точках прорастания спор, ветвления гиф и местах клеточного деления. Белок активирует процессы образования новой клеточной стенки, предположительно, путём модификации строения пептидогликана.

Специфическое, высоко упорядоченное клеточное деление при спорообразовании у *S.coelicolor* также контролируется белком SsgB. Этот белок также член семейства SALPs обнаружен у всех спорообразующих мицелиальных *Actinobacteria*. Гены *ssgA* и *ssgB* регулируются генами *whi*. В спорообразующих клетках происходит усиление экспрессии белка FtsZ. Регуляторный белок SsgB собирает FtsZ в местах локализации будущих перегородок в спорообразующих воздушных гифах. FtsZ организуется в спиралевидные структуры по длине спорогенной воздушной гифы, так называемые «лестницы» кольцевых структур из белка FtsZ, формируя упорядоченное множество Z-колец по длине гифы.

Согласно другой модели спорогенеза, SsgA локализуется вдоль спорообразующей гифы в определённых местах, в которых затем появляется белок SsgB. Далее SsgA покидает места будущих перегородок, в которых затем и появляется белок FtsZ [8]. Согласно этой модели, Z-кольца формируются в таких SsgB-FtsZ локусах.

Процесс заканчивается синхронным образованием перегородок в спорообразующей гифе и появлением цепочек гаплоидных спор [8, 10, 17, 35]. Посредством распространения спор стрептомицеты продвигаются в новые экологические ниши, осваивая новые места обитания [15].

В последнее время исследуется семейство белков GntR — факторов транскрипции, представленных в большом количестве в геноме модельной культуры *S.coelicolor* [37]. На значимость этих белков для жизнедеятельности актиномицетов с определённой указывает их широкое распространение и обилие у разных актиномицетов. Известно, что гены белков GntR преимущественно присутствуют в геномах свободно живущих актиномицетов — обитателей почвы, а не у патогенных форм. Предположи-

тельно, одной из их функций является контроль транспортной системы, что способствует адаптации популяции к резко меняющимся условиям окружающей среды.

Антибиотики как сигнальные молекулы

Среди различных метаболитов, синтезируемых стрептомицетами, самыми важными с точки зрения практического использования являются антибиотики.

Со времени открытия антибиотиков предполагалось, что их экологическая роль состоит только в угнетении конкурентов в окружающей среде. Основное количество данных, освещающих роль антибиотиков в жизнедеятельности популяций почвенных микроорганизмов, относится к проявлению их антагонистической активности в природе [38].

К настоящему времени установлено, что антибиотики имеют иные, более сложные, функции. Показано, что феномен, называемый гормезисом — проявление у низких концентраций ингибиторов свойств, отличных от действия высоких концентраций, наблюдается и у антибиотиков.

Субингибиторные концентрации (СК) антибиотиков модулируют транскрипцию генов, изменяя их экспрессию и воздействуя тем самым на процессы биосинтеза и транспорта, на метаболизм, на функционирование системы кворум-сенсинга, на ответные реакции микроорганизмов на стресс, на подвижность и морфологию клеток, подавляют или активируют процесс формирования биоплёнок, а также стимулируют вирулентность патогенных бактерий [39, 40]. При воздействии СК антибиотиков в бактериальных клетках происходит ряд генотипических изменений, включая активацию горизонтального переноса генов, а также повышение уровня мутагенеза [41—44]. Действие антибиотиков как сигнальных молекул реализуется через сигнальные системы, в основном через кворум-сенсинг.

Недавнее открытие способности СК антибиотиков влиять на процессы транскрипции дало основание рассматривать эти вещества в качестве сигнальных молекул, которые могут осуществлять межклеточную сигнализацию и участвовать в коммуникации также и в природных микробных сообществах. Предполагается, что присутствие СК антибиотиков в окружающей среде может активировать в природных микробиотах транскрипцию генов антибиотикоустойчивости [43].

Однако экологическую сигнальную роль СК антибиотиков, их влияние на состав и функционирование микробных сообществ в природе очень трудно продемонстрировать *in situ* ввиду сложности природных экосистем. Тем интереснее полученные экспериментальные данные о

влиянии СК на потребление широкого спектра субстратов почвенными стрептомицетами [45]. Воздействие СК (изучено пять антибиотиков) существенно изменяет у стрептомицетов (изучено 9 стрептомицетов) профиль потребления субстратов (изучено 95 субстратов): рост сильно ослабляется на одних субстратах или не происходит вовсе и усиливается на других субстратах. Особо отмечено, что некоторые изоляты растут на определённых субстратах только в присутствии в среде антибиотиков. Изменение количества и набора утилизируемых субстратов означает модификацию экологических ниш, при этом во многих случаях уменьшается их перекрывание и тем самым снижается уровень конкуренции в пищевых взаимоотношениях. Одни антибиотики (стрептомицин, рифампицин, ванкомицин) в СК снижают перекрывание экологических ниш, уменьшая для подавляющего числа изученных стрептомицетов уровень пищевой конкуренции, другие (хлорамфеникол, тетрациклин) способны к такому воздействию только в редких случаях.

Таким образом, под воздействием СК антибиотиков происходит изменение микробных фенотипов, результатом которого является изменение межвидовых взаимоотношений, а именно — снижение уровня пищевой конкуренции в микробной почвенной популяции. Авторы считают, что под действием СК возникают нейтральные или даже кооперативные взаимоотношения видов в микробной популяции, что дополняет общеизвестную концепцию конкуренции и взаимного «сопоставительного процесса усвершенствования», с одной стороны, «биологического оружия» (антибиотиков), и, с другой стороны, механизмов защиты микроорганизма-мишени (повышение антибиотикорезистентности) [45].

Программируемая клеточная смерть стрептомицетов

Программируемая клеточная смерть (ПКС) — апоптоз — генетически контролируемая, активная гибель клеток, процесс, присущий всем живым организмам, важнейшая часть нормального морфогенеза многоклеточных эукариотов. ПКС инициируется и контролируется многими специальными «пусковыми» факторами и биохимическими механизмами [46, 47].

Открытие ПКС у одноклеточных организмов — эукариот и прокариот явилось одним из новых и важных аспектов исследования их развития, физиологии и экологии [46, 48—50].

История исследования ПКС стрептомицетов, описание её типов, характерные морфологические и биохимические признаки, место и роль ПКС в жизнедеятельности стрептомицетов, генетические и молекулярные механизмы, вовлечён-

ные в процесс упорядоченной гибели мицелия, внешние условия, её инициирующие, — представлены в обзоре [51].

Описано несколько разных событий программируемой гибели мицелия, происходящих в разные фазы развития культуры: «первый раунд смерти», «второй раунд смерти» и «отсроченный лизис» [51].

ПКС, являясь частью нормального развития стрептомицетов, инициируется и контролируется специальной, заложенной в организм программой, происходит в строго определённых областях колонии в определённое время её развития, охватывая значительную массу гиф. Описано несколько разных событий программируемой гибели мицелия, происходящих в разные фазы развития культуры: «первый раунд смерти» — гибель вегетативного мицелия в ранний период его роста, «второй раунд смерти» — гибель субстратного мицелия перед образованием воздушного мицелия и гибель неспорулирующих участков воздушных гиф перед спорообразованием. Помимо этих событий в последнее время описан так называемый «отсроченный лизис», происходящий в полностью развитой культуре. В его регуляцию вовлечены серинтреонинпротеинкиназы эукариотического типа [51].

Наиболее известна гибель части гиф субстратного мицелия перед формированием воздушных гиф и гибель неспорулирующих участков воздушных гиф. Предполагается, что оно способствует созданию пула питательных веществ и сигнальных молекул для дальнейшего развития. В условиях ограничения ресурсов питания, в том числе и в природе, например в почве, гибель части гиф обеспечивает оставшуюся живой часть популяции ресурсами для продолжения жизни, спасая популяцию в целом [14]. В этом отношении ПКС стрептомицетов является таким же альтруистическим актом, как и многократно описаны случаи ПКС других бактерий [14, 47].

Имеется мнение, что именно в тот момент, когда происходит каскад событий (истощение первоначальных ресурсов, альтруистическая гибель части популяции с последующим накоплением в среде новых ресурсов) особенно целесообразным, своевременным представляется наблюдаемое образование антибиотиков как средств защиты популяции от неизбежного появления конкурентов в экологической нише с новым запасом ресурсов [29].

В обзоре, посвящённом ПКС стрептомицетов [51], обсуждается значение N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) (основного структурного компонента пептидогликана клеточной стенки бактерий, а также компонента широко распространённого в природе биополимера хитина) как сигнальной молекулы, инициирующей морфогенез и антиби-

отикообразование у стрептомицетов, и экологическая роль GlcNAc в программируемой гибели стрептомицетов в природе *in situ*. В механизме действия GlcNAc на ПКС спорообразование и синтез антибиотика ключевая роль принадлежит регуляторному белку DasR.

Так называемый «первый раунд» ПКС — гибель молодого мицелия, наблюдаемая на ранней стадии развития культуры, сразу после прорастания спор — является значимым этапом дифференциации стрептомицетов, в ходе которого происходят качественные морфологические и генетические сдвиги. После прорастания спор молодой, вегетативный мицелий, названный мицелием МI или компартментализированным, претерпевает программируемую гибель. Вместо него появляется мицелий синцитиальный, названный мицелием МII, в процессе развития приобретающий способность к спорообразованию и к биосинтезу вторичных метаболитов. События ПКС являются необходимым этапом дифференциации организма, определяющим переключение метаболизма с первичного на вторичный, в результате чего наступает состояние «готовности» продуцента к биосинтезу вторичных метаболитов [52—54].

Генетически запрограммированный процесс ПКС является закономерной стадией дифференциации стрептомицетов, в результате которой происходит закономерная смена разных типов мицелия и глобальные генетические изменения. Сделано также предположение, что в процессе ПКС мицелия МI могут происходить внутригенные перестройки, заключающиеся в изменении локализации генов в пределах хромосомы. При этом высвобождающиеся фрагменты ДНК могут быть встроены в ДНК многоядерного, продуктивного мицелия МII по механизму генетических рекомбинаций [55].

Значительным достижением в исследовании генетических механизмов ПКС стрептомицетов явилось обнаружение у *S.lividans* и *S.coelicolor* ТА-систем II типа. Известно, что у многих бактерий на хромосомах выявлены небольшие генетические модули — ТА-системы, одной из функций которых является вовлечённость в процесс программируемой гибели бактериальных клеток [50]. Наиболее изучена программируемая гибель клеток *Escherichia coli*, которая контролируется ТА-системой II типа — хромосомальным токсин-антитоксин модулем *mazE/mazF* [48, 56].

ТА-системы изученных стрептомицетов показали значительное сходство с ТА-системой II типа из семейства *YefM/YoeB*, ранее обнаруженной у *E.coli*. Модуль ТА в геноме *S.coelicolor* был обозначен как *yefMsc/yoeBsc*. Идентичный по нуклеотидной последовательности модуль в геноме *S.lividans* обозначен как *yefMsl/yoeBsl*. Функ-

циональный анализ, проведённый *in vivo*, впервые экспериментально непосредственно продемонстрировал вовлечённость этих ТА-систем в ПКС стрептомицетов [57].

Известно, что ТА-система II типа состоит из двух генов, кодирующих два её компонента: стабильный белок-токсин и нестабильный белок-антитоксин [50]. Ген *yefM* кодирует белок YefM — нестабильный антитоксин, а ген *yoeB* кодирует белок YoeB — стабильный токсин, относящийся к эндорибонуклеазам. В сбалансированных условиях роста эти гены ко-экспрессируются, и антитоксин предотвращает действие токсина. Таким образом, происходит ауторегуляция активности ТА-системы. Под действием разнообразных неблагоприятных сигналов окружающей среды нестабильный антитоксин разрушается протеазой ClpAP, и более стабильный оставшийся токсин вызывает гибель клеток или остановку их роста [50].

Оба белка (токсин и антитоксин) изучаемых стрептомицетов показали идентичность с YefM и YoeB белками из *E.coli*. Молекулярный механизм действия ТА-системы обоих стрептомицетов идентичен таковому у *E.coli*, а именно состоит в ингибировании синтеза белка токсином YoeB.

Сверхэкспрессия гена *yoeBsl* в диких штаммах *S.lividans* и *S.coelicolor*, в клетках мутантного штамма *E.coli* SC36, дефектного по модулю *yefM-yoeB*, как и экспрессия его единственной копии в мутантном штамме *S.lividans*, дефектном по ТА-системе, приводит к угнетению колониеобразования этих штаммов. Токсический эффект снимается ко-экспрессией гена *yefMsl*, кодирующего антитоксин YefM. Таким образом, получены *in vivo* прямые экспериментальные доказательства того, что белок, кодируемый геном *yoeBsl*, и есть токсин, угнетающий рост клеток стрептомицетов, а белок, кодируемый геном *yefMsl*, нивелирует его токсичное действие при одновременной с ним экспрессии.

У мутантов *S.coelicolor* и *S.lividans* с делецией полного оперона *yefM/yoeB* спорообразование начинается в более поздние сроки по сравнению со штаммами дикого типа. Опираясь на известные данные о множественности функций бактериальных ТА-систем, авторы считают, что функция описанной ими стрептомицетной ТА-системы не может быть ограничена только вовлечённостью в процесс ПКС, и необходимы дальнейшие исследования для понимания роли ТА-систем в жизнедеятельности стрептомицетов [57].

В контексте того, что стрептомицеты являются типичными обитателями разнообразных экологических ниш, обращает на себя внимание отмеченная закономерность: у свободноживущих бактерий ТА-системы могут занимать до 2% размеров их генома, тогда как в геномах облигатных внутриклеточных организмов, тесно ассоциированных с

организмом хозяина, такие системы или обнаруживаются редко, или вовсе отсутствуют [58]. Эти данные соответствуют выдвинутой гипотезе о том, что одной из важнейших функций хромосомных ТА-систем у бактерий является быстрая адаптация к стрессу, что особенно важно именно для свободноживущих организмов в быстро и резко меняющихся условиях существования [59, 60].

Сообщается, что в геноме исследованных стрептомицетов было аннотировано наличие 24 ТА-систем [57]. Кодирование большого количества ТА-систем в геноме разных стрептомицетов прямо указывает на их важные физиологические функции в клетке, одной из которых, как было прямо документировано, является инициирование ПКС. Предполагается, что одной из важнейших физиологических функций бактериальных ТА-систем является контроль роста клеток как адаптация к условиям внешней среды, гибкая защита всей популяции от гибели при возникновении неблагоприятных условий [49, 50, 60].

Биоплёнки стрептомицетов

Хотя биоплёнки являются широко распространённым, универсальным способом существования бактерий [61], вопрос о том, могут ли микелиальные организмы — стрептомицеты существовать также и в виде биоплёнок, до относительно недавнего времени даже не рассматривался. Однако биоплёнки, в формировании которых участвуют стрептомицеты, обнаружены и в природных экологических нишах, и в промышленных, и в клинических условиях, образуясь на абиотических и биотических субстратах. Имеющиеся в литературе сведения о встречаемости биоплёнок в природных и антропогенных условиях, о видовом составе стрептомицетов, способных формировать биоплёнки, об их влиянии — положительном или вредном на разные области практической деятельности человека, а также о перспективах использования биоплёнок для промышленного получения практически значимых веществ, обсуждаются в обзорах [5, 62].

Биоплёнки стрептомицетов — моновидовые или в сообществе с другими микроорганизмами также, как и биоплёнки других микроорганизмов, существуют как агрегированное сообщество множества клеток, погружённое в общий внеклеточный матрикс, состоящий из полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот, и прикреплённое к твёрдому субстрату — абиотическому или биотическому. Известно, что важнейшими свойствами бактериальных биоплёнок являются их пространственная и метаболическая структурированность, наличие определённой организации всего сообщества, возможность регулирования межвидовых метаболических отношений её членов в

пищевых цепях, а также возможность регулирования сигнальных процессов.

Образование бактериальных биоплёнок, контролируемое сложным каскадом сигналинга и внеклеточными регуляторными молекулами, дало основание рассматривать биоплёнки как одну из форм бактериальной многоклеточности [17, 18, 61].

Впервые об образовании стрептомицетами биоплёнок было заявлено, повидимому, в 2004 г., когда было показано, что мицелиальные структуры (пеллеты), формирующиеся при росте *S.coelicolor* в условиях погруженного роста в присутствии в питательной среде нерастворимых частиц, обладают классическими признаками биоплёнок. Авторы описали их как структуры, составленные множеством гиф, прикрепленных к твёрдому субстрату и погруженных во внеклеточный матрикс, в составе которого были обнаружены гиалуроновая кислота и ДНК [63]. Позднее было показано, что внеклеточный матрикс, удерживающий целостность многоклеточных мицелиальных структур у стрептомицетов, содержит белки, полисахариды и внеклеточную ДНК [64].

Формирование биоплёнок стрептомицетами начинается с колонизации поверхности спорами или мицелием, причём важным первоначальным этапом формирования биоплёнки является прикрепление к субстрату, адгезия стрептомицета на поверхности. Впервые на примере *S.coelicolor* показано, что адгезия стрептомицета на гидрофобных поверхностях происходит при участии сурфактантных амилоидных морфогенетических белков *chaplins*, которые, как известно, участвуют в формировании воздушного мицелия.

Помимо белков *chaplins* в адгезии стрептомицетов играет большую роль целлюлоза [31]. В процессе адгезии *S.granaticolor* участвуют дигидролипоамиддегидрогеназа, амидофосфорибозилтрансфераза, цистатионин β -синтаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [65].

Растущие гифы стрептомицетов создают единую структуру, погружённую во внеклеточный матрикс. Формирование биоплёнок культурой *S.griseus* происходило при его культивировании в токе протекающей жидкости в тубулярном биореакторе, тогда как при росте в лунках планшетов — стационарном или со слабым встряхиванием — биоплёнки не формировались [66]. Монобиоплёнки *S.griseus*, полученные в условиях эксперимента в потоке жидкости, описаны как целостная, цилиндрическая, относительно прочная структура, представляющая собой очень плотную сеть из множества гиф. После отрыва такой биоплёнки от субстрата и вынесения её с током жидкости из биореактора происходят новые циклы самостоятельного прикрепления стрептомицета и формирования им новых биоплёнок без дополнительного внесения нового посевного материала [66].

Различия в пространственной организации структурных формирований стрептомицетов — колоний и биоплёнок сопровождаются существенными различиями и в их физиолого-биохимическом статусе. Эти сдвиги метаболической активности микроорганизмов в биоплёнках по сравнению с «планктонными» клетками хорошо известны и с успехом используются в биотехнологической промышленности [62]. При культивировании бактерий-продуцентов в виде биоплёнок достигается существенно более высокий выход конечного желаемого продукта по сравнению с обычным способом культивирования этих продуцентов в виде «планктонных» клеток. Так, например, по технологии, основанной на использовании биоплёнок продуцента, уксусная кислота производится в промышленных масштабах [67, 68].

Как было показано на некоторых примерах, сдвиг метаболической активности не является только следствием ко-синтеза — явления, наблюдаемого при обычном совместном культивировании разных микроорганизмов. Из эстуария — специфической природной экологической ниши был выделен стрептомицет — продуцент антибиотика актиномицина D, формирующий биоплёнки в местах своего естественного обитания. При культивировании его также в виде биоплёнок в экспериментальных условиях, имитирующих условия природной среды обитания, он показывает более высокий уровень и более высокую скорость биосинтеза антибиотика по сравнению с почвенным штаммом продуцента, выращиваемым в условиях обычного периодического культивирования [69]. Трудности искусственного культивирования аборигенного стрептомицета, формирующего биоплёнки в естественных местах обитания и адаптированного к комплексу специфических экстремальных условий в природе, были разрешены путём копирования в лаборатории этой природной экологической ниши.

Тот же приём — имитация природных условий для культивирования в лабораторных условиях — был с успехом ранее применён для микроорганизма-нефтеоокислителя. Для него были разработаны условия культивирования, имитирующие природные, с целью формирования им искусственной биоплёнки. При этом также был достигнут требуемый положительный эффект — получено существенное повышение эффективности утилизации н-гексадекана [70].

S.mirabilis, способный существовать в виде биоплёнок, обладает высокой способностью к детоксикации окружающей среды, удаляя из неё токсичное соединение шестивалентного хрома K₂Cr₂O₇ посредством ферментативной трансформации в менее токсичное соединение трехвалентного хрома. Если биоплёнки *S.mirabilis* толе-

рантны к $K_2Cr_2O_7$, то обычная культура стрептомицета не обладает толерантностью к токсическому действию этого соединения. Детоксикационная активность биоплёнок *S.mirabilis* существенно выше, чем у его «планктонных» клеток. Удаление из среды токсического соединения хрома $K_2Cr_2O_7$ происходит существенно быстрее и в более полной степени именно биоплёнками *S.mirabilis* [71].

Существование стрептомицетов в форме биоплёнок даёт им очевидные экологические преимущества, как это имеет место и для других микроорганизмов. В биоплёнках популяции обеспечена возможность выживания в сложных и экстремальных условиях. Микроорганизмы, живущие в форме биоплёнок, обладают более высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды и воздействию ксенобиотиков. В биоплёнках они оказываются более приспособленными к окружающей среде, получая многие существенные преимущества: устойчивость к самым различным факторам стресса, приходящим из окружающей среды (например, к механическому вымыванию, к воздействию антибиотиков), способность более полно потреблять питательные ресурсы, эффективную защиту от хищников, способность в целом к более успешной колонизации новых мест обитания, определённые «полезные» сдвиги в метаболической активности и др.

Факторов окружающей среды слишком много, чтобы вычленил те, которые направляют развитие по пути: колония/биоплёнка в каждом отдельном случае. Скорее всего первотолчком к образованию биоплёнок является возникновение неблагоприятных условий, а может быть наоборот — представляющаяся возможность перейти в более выгодную форму существования, поскольку жизнь в биоплёнках даёт много преимуществ.

***Streptomyces olivocinereus* как объект для изучения роста и дифференциации стрептомицетов**

Этот микроорганизм был выделен и в течение ряда лет изучался группой исследователей Московского государственного университета. Здесь мы приводим результаты исследований роста и морфогенеза *Streptomyces olivocinereus* на лабораторных средах и непосредственно в почве в связи с количественными и пространственными характеристиками биосинтеза синтезируемого им антибиотика, а также приводим результаты изучения динамики его популяции в естественной среде обитания и других сторон его биологии.

Streptomyces olivocinereus, типичный обитатель почвы, образует антибиотик — гелиомицин (резистомицин) [72, 73], обладающий яркой харак-

терной люминесценцией, которая хорошо видна и в отдельных гифах, и в колониях его продуцентов. Это даёт возможность использовать *S.olivocinereus* как эффективный и удобный инструмент исследования ключевых событий роста и дифференциации стрептомицетов *on line* — на лабораторных средах, и в естественных местах обитания *in situ*.

Рост стрептомицетов, как и рост других мицелиальных организмов — грибов, подчиняется линейной зависимости. Гифы стрептомицетов увеличиваются в длину с постоянной скоростью, удлинение происходит в апикальной области [72, 73]. В культуре *S.olivocinereus* возможно наблюдать полярность процесса прорастания спор и апикальный характер роста мицелия. Рост продуцента на жидких средах имеет ярко выраженный диауксический характер. В первую фазу экспоненциального роста происходит рост образовавшихся трубок прорастания, затем, до начала ветвления гиф, рост мицелия идет с постоянной скоростью. Вторая фаза экспоненциального роста начинается после того, как мицелий после достижения определённой длины приступает к ветвлению с образованием новых точек роста. После прорастания спор каждая отдельная гифа растёт линейно, однако кинетика роста всего мицелия имеет экспоненциальный характер за счёт ветвления гиф.

Гелиомицин детектируется уже в прорастающих спорах, сначала в точке прорастания, ещё до формирования ростовых трубок, потом — в апикальных участках удлиняющихся ростовых трубок, а затем — в апикальных участках молодых растущих гиф. Начало биосинтеза гелиомицина относится к раннему периоду активного роста культуры, к первой фазе экспоненциального роста. При этом биосинтез топографически связан с местами активного роста [75].

В фазу активного роста погружённой культуры гелиомицин обнаруживается в мицелии продуцента в форме, обладающей жёлтой люминесценцией, антибиотик диффузно локализован в гифах. В фазу стационарного роста, когда синтезируется основное количество антибиотика, гелиомицин локализуется в вакуолярных структурах вместе с липидами в виде чётко очерченных светопреломляющих гранул с оранжевой люминесценцией. Появление гранул гелиомицина совпадает с фазой стационарного роста продуцента и «сверхсинтезом» антибиотика. Таким образом, характер люминесценции гелиомицина меняется при переходе от фазы активного роста к фазе стационарного роста. Тем самым визуализируется возрастная гетерогенность гифы по длине — одновременно в ней есть апикальный участок активного роста, где происходит активный синтез антибиотика, и, на удалении от апикальной части

гифы, зона замедления и/или остановки роста, где происходит образование гранул антибиотика с липидами, накопление синтезированного гелиомицина [75, 76].

В местах активного роста продуцента (трубки прорастания, апикальные участки растущих гиф, периферическая зона роста колонии на плотных средах, внешний слой мицелиальных «клубочков» на жидких средах) гелиомицин обнаруживается только в форме с желтой люминесценцией, с диффузной локализацией. Напротив, области, где выявлены гранулы гелиомицина с оранжевой люминесценцией, совпадают с областями остановки роста мицелия. Закономерный характер локализации гелиомицина и те две формы, в которых он выявлен в культуре продуцента, являются функцией возраста мицелия.

На примере *S.olivocinereus* визуализируется не только функциональная гетерогенность одной и той же гифы стрептомицетов, но также и вся сложность морфологической и функциональной архитектоники их колоний.

В ходе роста и развития *S.olivocinereus* на плотных средах происходит структурирование колонии по областям локализации разных форм антибиотика и отдельных ферментов (α -сукцинатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, кислой фосфатазы, щелочной фосфатазы), которые на вертикальных срезах зрелой колонии закономерно расположены в виде полусферических слоев, повторяющих полусферическую форму её субстратной части [77].

Характерная, отчётливо выраженная «слоистость» колонии *S.olivocinereus* определяется закономерностями апикального характера роста мицелия [78]. В периферическом слое, где колония нарастает в радиальных направлениях апикальными участками гиф (так называемая периферическая зона роста) гелиомицин выявлен в форме с желтой диффузной люминесценцией. В центральной области колонии, где рост гиф *S.olivocinereus* замедляется и/или останавливается, гелиомицин локализован в виде гранул с оранжевой люминесценцией. Центральная часть колонии составлена гифами с яркой оранжевой люминесценцией. Таким образом, в целой колонии, как и в индивидуальной растущей гифе, зоны локализации двух люминесцирующих форм гелиомицина пространственно разграничены, что может служить морфологическим критерием дифференциации [76, 77].

Морфологическая и физиологическая дифференциация колонии *S.olivocinereus* в виде правильных полусферических слоев полностью соответствует апикальной модели роста стрептомицетов и его линейному характеру.

Целостность колонии стрептомицетов как высокодифференцированной и сложно органи-

зованной структуры проявляется и в её адекватном поведении в ответ на изменяющиеся условия внешней среды. Изменение радиальной скорости роста, ширины периферической зоны роста и плотности мицелия в колонии происходит скоординировано. Линейный характер роста колоний стрептомицетов (на примере *S.olivocinereus*, *S.baarnensis*, *S.lavendulae*) на плотных средах сохраняется при разных концентрациях глюкозы в питательной среде, но сама величина радиальной скорости роста зависит от содержания глюкозы. У изученных стрептомицетов радиальные скорости роста колонии достигают наивысших значений при низких концентрациях источника углерода в среде (менее 0,1 г/л глюкозы) [74, 79].

Экспериментально зафиксированной самой высокой радиальной скорости роста соответствует широкая периферическая зона роста и сильная разреженность мицелия в колонии. Колония нарастает преимущественно по поверхности среды, конечный радиус ее больше, чем у колонии, растущей на среде с высоким содержанием глюкозы, но мицелий имеет относительно более разреженную структуру и результирующая общая биомасса меньше. При увеличении концентрации глюкозы в среде уменьшается ширина периферической зоны роста колонии, снижается радиальная скорость роста и уменьшается конечный радиус колонии. На средах с высоким содержанием глюкозы возрастает плотность мицелия в колонии в результате более интенсивного ветвления гиф. Колония нарастает преимущественно по вертикали, формируя сложный профиль и накапливая значительно большую биомассу [74, 79].

Полученные экспериментальные данные иллюстрируют преимущества мицелиальной организации и, в частности, апикального характера роста при освоении экологического пространства [17]. Обнаруженные закономерности ростовой реакции изученных стрептомицетов при изменениях концентрации ресурса в среде таковы, что позволяют рассматривать колонию как организм с определённым уровнем структурно-функциональной целостности, допуская описание стратегии роста в антропоморфных терминах. При ограничении ресурса в среде колония «стремится» к распространению, к быстрому «захвату» большей территории, радиальная скорость её роста — максимальная, но общая биомасса относительно низкая, рыхлый мицелий быстро стелется по поверхности среды, «торопясь осваивать» новые пространства. При избытке ресурса стрептомицет, снижая радиальную скорость роста, остаётся на территории с богатым содержанием ресурса, «удовлетворяясь» её освоением. При этом формируется более плотная колония с усложнённым профилем, значительно вытянутая вертикально [79].

Полученные данные могут быть использованы в дискуссии по вопросу о том, имеет ли колония стрептомицетов признаки многоклеточного организма, как аргументы в поддержку этого представления.

С помощью *S.olivocinereus* было получено первое, повидимому, прямое доказательство образования антибиотика продуцентом в природном месте своего обитания — в нестерильной нативной почве *in situ*. Показано, что единичная микроколония продуцента способна синтезировать антибиотик в единичной почвенной микрозоне, при этом можно проследить его дальнейшую судьбу *in situ* [80].

Гелиомицин в мицелии продуцента при росте его как в почве, так и на лабораторных средах обнаруживается в точке прорастания споры ещё до появления ростовой трубки. Затем антибиотик визуализируется в небольших участках гиф (1—1,5 мк), которые после утолщаются в 2—3 раза. Участки гиф, содержащие гелиомицин, сильно деформируются и приобретают вид отдельных ярко люминесцирующих образований. После распада колонии продуцента гелиомицин, в виде одиночных люминесцирующих гранул и/или их скоплений (до 5—6 мк в диаметре) обнаруживается среди почвенных частиц, а также на почвенных частицах, сохраняясь в почве свыше 2 мес наблюдения [80].

В почве формирование индивидуальных микроколоний *S.olivocinereus* происходит в отдельных почвенных микрозонах, как правило, удалённых друг от друга. Гифы стрептомицета пронизывают почвенные частицы, около кусочков корней и растительных остатков образуются более крупные микроколонии. Таким образом, визуализировано утверждение, что образование и нахождение антибиотика в почве ограничено набором тех микрозон, в которых есть для этого благоприятные условия.

Полученная картина совпадает с общим представлением о том, что стрептомицеты пребывают в почве дискретно, а не распределены в толще почвы равномерно [81, 82].

Позже методы люминесцентного анализа были применены для прямого выявления в почве окситетрациклина [83]. С использованием сконструированного биосенсора — интактных клеток *Escherichia coli* MC4100, специфически люминесцирующих в присутствии окситетрациклина, продемонстрировано образование антибиотика его продуцентом *S.rimosus* в микрокосме со стерильной почвой.

S.olivocinereus оказался удобной моделью также для изучения циклического развития стрептомицетов в природе: динамики популяции в естественной среде её обитания, возможных механизмов регуляции её численности, прост-

ранственно-временной миграции стрептомицетов в толще почвы *in situ*. С использованием *S.olivocinereus* как инструмента экологических исследований получена принципиальная возможность изучения выявления и учёта в почве индивидуальной микробной популяции. В опытах с микрокосмом показана зависимость роста и развития *S.olivocinereus* и его способности продуцировать гелиомицин от типа почвы и от конкретных факторов среды обитания [80,84]. Таким образом, полученные данные по экологии *S.olivocinereus* раскрывают те условия существования, которые инициируют биосинтез гелиомицина в природе, и которые могут быть использованы при организации получения антибиотика.

Возможность для прорастания спор, формирование микроколоний, образование гелиомицина определяется типом почвы. Для *S.olivocinereus* эти процессы активно проходят в почвах, характеризующихся хорошей структурированностью, высоким содержанием гумуса, нейтральным или слабо щелочным значением pH, т.е. в каштановых почвах и черноземах, предоставляющих продуценту необходимый комплекс благоприятных условий для его развития и для биосинтеза им антибиотика. Например, в нативных черноземных почвах образование антибиотика отмечается уже на вторые сутки развития продуцента. В нативных почвах (подзолистая, краснозем, желтозем), из которых одни имеют малое содержание гумуса, другие кислую реакцию среды и т.п., внесенные одиночные споры даже не прорастают [85, 86]. Это коррелирует с данными о том, что стрептомицеты — продуценты гелиомицина в природе встречаются, в основном, в черноземах, каштановых, в горных серо-бурых и буро-коричневых почвах [87].

В условиях, приближенных к естественным, в длительном полевом опыте, после внесения спор *S.olivocinereus* в почву происходит его расселение из поверхностного слоя в более глубокие слои почвы. Это свидетельствует о том, что *S.olivocinereus* в своем природном местообитании (при наличии соответствующих условий) проходит все стадии нормального морфогенеза, аналогично развитию в лабораторных условиях. Таким образом, в природных экологических нишах стрептомицет способен пройти все стадии нормального морфогенеза, формируя споры, синтезируя антибиотик и будучи полностью способным к распространению и к освоению других экологических ниш [86].

Заключение

Многоэтапный жизненный цикл стрептомицетов, наиболее сложный среди прокариотов, специфическая архитектура колоний свидетель-

ствуют о том, что эти бактерии кардинально отличаются от других групп бактерий. Колония стрептомицетов закономерно развивается как единая, целостная структура, в которой клетки специализируются в пространстве и времени. С одной стороны, высокая целостность и, с другой стороны, морфологическая и физиологическая дифференцированность образуемых структур — результат деятельности не единого контролирующего центра, но эффективной согласованной работы молекулярных и генетических механизмов. Закономерность, строгая последовательность процессов роста и дифференциации обеспечены скоординированной работой внецеллюлярных сигналов и сложных регуляторных сетей.

Архитектура колонии демонстрирует соответствие условиям окружающей среды так, что ответ популяции на вызов изменяющейся среды, характеризуется как оптимальный.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие. Антибиотики и химиотерапия 2013; 58: 5–6: 38–48. / Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Polin A.N., Kozhevina P.A. Uстойchivost' mikroorganizmov k antibiotikam: rezistoma, ee ob'em, raznoobrazie i razvitie. Antibiotiki i himioter 2013; 58: 5–6: 38–48. [in Russian]
2. Kolter R., van Wezel G.P. Goodbye to brute force in antibiotic discovery? 2016 Doi 10.1038/nmicrobiol.2015.20
3. Seipke R.E., Kaltenpoth M., Hutchings M.I. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 4: 862–876.
4. Flårdh K., Buttner M.J. Streptomyces morphogeneticus: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat Rev Microbiol 2009; 7: 1: 36–49.
5. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. О биоплёнках стрептомицетов. I. Распространение и формирование. Антибиотики и химиотерапия 2015; 60: 1–2: 44–55. / Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Polin A.N., Kozhevina P.A. O bioplenkah streptomycetov. I. Rasprostraneniye i formirovaniye. Antibiotiki i himioter 2015; 60: 1–2: 44–55. [in Russian]
6. Прокофьева-Бельговская А.А. Строение и развитие актиномицетов. М.: Изд-во АН СССР, 1963. / Prokof'eva-Bel'govskaya A.A. Stroeniye i razvitie aktinomycetov. M.: Izd-vo AN SSSR, 1963. [in Russian]
7. Kalakoutskii L.V., Agre N.S. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. Bact Rev 1976; 40: 2: 469–524.
8. Mc Cormic J.R., Flårdh K. Signals and regulators that govern Streptomyces development. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 1: 206–231.
9. Yagüe P., López-García M.T., Rioseras B. et al. Pre-sporulation stages of Streptomyces differentiation: state-of-the-art and future perspectives. FEMS Microbiol Lett 2013; 342: 2: 79–88.
10. Van Dissel D., Claessen D., van Wezel G.P. Morphogenesis of Streptomyces in submerged cultures. Adv Appl Microbiol 2014; 89: 1–45.
11. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Высшая школа 1969. / Egorov N.S. Osnovy ucheniya ob antibiotikah. M.: Vysshaya shkola 1969. [in Russian]
12. Shapiro J.A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu Rev Microbiol 1998; 52: 81–104.
13. Miguélez E.M., Hardisson C., Manzanal M.B. Hyphal death during colony development in Streptomyces antibioticus: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. J Cell Biol 1999; 145: 3: 515–525.
14. Miguélez E.M., Hardisson C., Manzanal M.B. Streptomyces: a new model to study cell death. Internat Microbiol 2000; 3: 3: 153–158.
15. Elliot M.A., Buttner M.J., Nodwell J.R. Multicellular development in Streptomyces. In « Myxobacteria: Multicellularity and differentiation ». / Ed. Whirworth D.E. 2008 ASM Press, 419–438 ASM Press, Herndon, VA Washington, D.C.
16. Rosenberg S.M. Life, death, differentiation, and the multicellularity of bacteria. PLoS Genetics 2009; 3: e1000418
17. Claessen D., Rozen D.E., Kuipers O.P. et al. Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. Nat Rev Microbiol 2014; 12: 2: 115–124.
18. Lyons N.A., Kolter R. On the evolution of bacterial multicellularity. Curr Opin Microbiol 2015; 24: 21–28.
19. Кожевина Л.С., Виноградова К.А., Струве М.Е. Морфологическая и цитохимическая дифференциация колоний актиномицетов-продуцентов гелиомицина в процессе развития на плотных средах. Биол науки 1982; 8: 88–91. / Kozhevina L.S., Vinogradova K.A., Struve M.E. Morfologicheskaya i citohimicheskaya differenciatsiya koloniy aktinomycetov-produtsentov geliomicina v processe razvitiya na plotnyh sredah. Biol nauki 1982; 8: 88–91. [in Russian]
20. Flårdh K., Richards D. M., Hempel A. M. et al. Regulation of apical growth and hyphal branching in Streptomyces. Curr Opin Microbiol 2012; 15: 6: 737–743.
21. Hempel A.M., Cantlay S., Molle V. et al. The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria Streptomyces. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: 35: 2371–2379.
22. Holmes N.A., Walshaw J., Leggett R.M. et al. Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in Streptomyces. Proc Nat Acad Sci 2012; 110: 5: 397–406.
23. Saalbach G., Hempel A.M., Vigouroux M. et al. Determination of phosphorylation sites in the DivIVA cytoskeletal protein of Streptomyces coelicolor by targeted LC-MS/MS. J Proteome Res 2013; 12: 9: 4187 Flårdh4192.
24. Fuchino K., Bagch S., Cantlay S. et al. Dynamic gradients of an intermediate filament-like cytoskeleton are recruited by a polarity landmark during apical growth. Proc Nat Acad Sci 2013; 110: 21: 1889–1897.
25. Petoňková K., Petoňek M. Eukaryotic-type protein kinases in Streptomyces coelicolor: variations on a common theme. Microbiology 2003; 149: 7: 1609–1621.
26. Claessen D., Rink R., de Jong W. et al. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation of Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils. Genes Dev 2003; 17: 14: 1714–1726.
27. Claessen D., de Jong W., Dijkhuizen L., Wosten H.A. Regulation of Streptomyces development: reach for the sky! Trends Microbiol 2006; 14: 7: 313–319.
28. Bush M.J., Tschown N., Schlimpert S. et al. c-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes. Nat Revs Microbiol 2015; 13: 12: 749–760.
29. Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2016; 80: 1–43. doi:10.1128/MMBR.00019-15
30. Capstick D.S., Willey J.M., Buttner M.J., Elliot M.A. SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in Streptomyces coelicolor. Mol. Microbiol 2007; 64: 3: 602–613.
31. de Jong W., Wosten H.A.B., Dijkhuizen L., Claessen D. Attachment of Streptomyces coelicolor is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. Mol Microbiol 2009; 73: 6: 1128–1140.
32. Chater K.F., Biró S., Lee K.J. et al. The complex extracellular biology of Streptomyces. FEMS Microbiol Rev 2010; 34: 2: 171–198.

33. Pérez J., Muñoz-Dorado J., Braña A.F. et al. *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. Microbial Biotechnol 2011; 4: 2: 175—183.
34. Хохлов А.С., Товарова И.И., Борисова Л.Н. и др. А-фактор, ответственный за биосинтез стрептомицина мутантными штаммами *Actinomyces streptomycini*. Доклады АН СССР. 1967; 177: 1: 232—235. / Hohlov A.S., Tovarova I.I., Borisova L.N. i dr. A-faktor, otvetstvennyj za biosintez streptomitsina mutantnymi shtammami *Actinomyces streptomycini*. Doklady AN CCCR. 1967; 177: 1: 232—235. [in Russian]
35. Traag B.A., van Wezel G.P. The SsgA-like proteins in actinomycetes: small proteins up to a big task. Antonie van Leeuwenhoek 2008; 94: 85—97.
36. McCormick J.R. Cell division is dispensable but not irrelevant in *Streptomyces*. Curr Opin Microbiol. 2009; 12: 6: 689—698.
37. Tsyplik O., Yushchuk O., Zburannyi N. et al. Transcriptional regulators of GntR family in *Streptomyces coelicolor* A3(2): analysis *in silico* and *in vivo* of YtrA subfamily. Folia Microbiol 2015; 6: 3: 209—220.
38. Виноградова К.А., Кожевин П.А. Взаимоотношения актиномицетов с почвенными грибами и их использование для биологического контроля фитопатогенов. Микология и фитопатол 2011; 45: 4: 289—302. / Vinogradova K.A., Kozhevina P.A. Vzaimootnosheniya aktinomicetov s pochvennymi gribami i ih ispol'zovanie dlja biologicheskogo kontrolja fitopatogenov. Mikologija i fitopatol 2011; 45: 4: 289—302. [in Russian]
39. Булгакова В.Г., Виноградова К.А., Орлова Т.И. и др. Действие антибиотиков как сигнальных молекул. Антибиотики и химиотерапия 2014; 59: 1—2: 36—43. / Bulgakova V.G., Vinogradova K.A., Orlova T.I. i dr. Dejstvie antibiotikov kak signal'nyh molekul. Antibiotiki i himioter 2014; 59: 1—2: 36—43. [in Russian]
40. Кожевин П.А., Виноградова К.А., Булгакова В.Г. Природные функции антибиотиков как «информбиотиков». Вестник МГУ 2014; 17: 3: 3—9. / Kozhevina P.A., Vinogradova K.A., Bulgakova V.G. Prirodnye funkicii antibiotikov kak «informbiotikov». Vestnik MGU 2014; 17: 3: 3—9. [in Russian]
41. Yim G., Wang H.H., Davies J. Antibiotics as signalling molecules. Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci 2007; 362: 1483: 1195—1200.
42. Fajardo A., Martinez J.L. Antibiotics as signals that trigger bacterial responses. Curr Opin Microbiol 2008; 11: 2: 161—167.
43. Aminov R.I. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. Front. Microbiol 2011; 2: 158.
44. Blázquez J., Couce A., Rodríguez-Beltrán J., Rodríguez-Rojas A. Antimicrobials as promoters of genetic variation. Curr Opin Microbiol 2012; 15: 5: 561—569.
45. Vaz Jauri P., Bakker M.G., Salomon C.E., Kinkel L.L. Subinhibitory antibiotic concentrations mediate nutrient use and competition among soil *Streptomyces*. PLoS ONE 2013; 8: e81064.
46. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягельская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция. Биохимия 2004; 69: 10: 1301—1313. / Gordeeva A.V., Labas Ju.A., Zvjagil'skaja R.A. Apoptoz odnokletochnyh organizmov: mehanizmy i jevoljucija. Biohimija 2004; 69: 10: 1301—1313. [in Russian]
47. Гордеева А.В., Лабас Ю.А. Одноклеточные альтруисты. Природа 2005; 6: 41—48. / Gordeeva A.V., Labas Ju.A. Odnokletochnye al'truisty. Priroda 2005; 6: 41—48 [in Russian]
48. Engelberg-Kulka H., Amitai S., Kolodkin-Gal I., Hazan R. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. PLoS Genet. 2006; 2: 10: 1518—1526.
49. Кокшарова О.А. Бактерии и фенотоп. Биохимия 2013; 78: 9: 1229—1238. / Koksharova O.A. Bakterii i fenotop. Biohimija 2013; 78: 9: 1229—1238
50. Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., De Laurenzi V. Community: a programmed cell death in bacteria. Cell Death Dis 2015; 6: e1609; doi:10.1038/cddis.2014.570
51. Филиппова С.Н., Виноградова К.А. Программируемая клеточная смерть как одна из стадий дифференциации стрептомицетов. /в печати / Filippova S.N., Vinogradova K.A. Programmiruemaja kletocchnaja smert' kak odna iz stadij differenciacii streptomycetov. /v pechati [in Russian]
52. Manteca Á., Fernandes M., Sánchez J. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. BMC Microbiol 2005; 5: 51.
53. Yagüe P., Rodríguez-García A., López-García M.T. et al. Transcriptional analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. PLoS One. 2013b; 8: 3: e60665.
54. Rioseras B., López-García M.T., Yagüe P. et al. Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. Bioresource Technol 2014; 151: 191—198.
55. Yague P., Lopez-Garcia M. T., Rioseras B. et al. New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production. Curr Trends Microbiol 2012; 8: 65—73.
56. Erental A., Kalderon Z., Saada A. et al. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. mBio.2014. doi: 10.1128/mBio.01426-14.
57. Sevillano L., Diaz M., Yamaguchi Y. et al. Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. PLoS One 2012; 7: 3: e32077.
58. Прохоров А.А., Даниленко В.Н. Системы «токсин-антитоксин» у бактерий: инструмент апоптоза или модуляторы метаболизма? Микробиология 2010; 79: 2: 147—159. / Prozorov A.A., Danilenko V.N. Sistemy «toksin-antitoksin» u bakterij: instrument apoptoza ili moduljatory metabolizma? Mikrobiologija 2010; 79: 2: 147—159. [in Russian]
59. Pandey D.P., Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. Nucleic Acids Res 2005; 33: 3: 966—976.
60. Schuster C.F., Bertram R. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. FEMS Microbiol Lett 2013; 340: 2: 73—85.
61. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? Микробиология 2007; 76: 2: 149—163. / Nikolaev Ju.A., Plakunov V.K. Bioplenka — «gorod mikrobov» ili analog mnogokletochnogo organizma? Mikrobiologija 2007; 76: 2: 149—163.
62. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. О [in Russian] биопленках стрептомицетов. II. Биотехнологическое использование. Антибиотики и химиотерапия 2015; 60: 5—6: 27—33. / Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Polin A.N., Kozhevina P.A. O bioplenkah streptomycetov. II. Biotechnologicheskoe ispol'zovanie. Antibiotiki i himioter 2015; 60: 5—6: 27—33. [in Russian]
63. Kim Y.M., Kim J.H. Formation and dispersion of mycelial pellets of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). J Microbiol 2004; 42: 1: 64—67.
64. van Dissel D., Claessen D., Roth M., van Wezel G.P. A novel locus for mycelial aggregation forms a gateway to improved *Streptomyces* cell factories. Microbial Cell Factories 2015; 14: 44: 2—10.
65. Petrádková D., Buriánková K., Tesařová E. et al. Surface hydrophobicity and roughness influences the morphology and biochemistry of streptomycetes during attached growth and differentiation. FEMS Microbiol Lett. 2013; 342: 2: 147—156.
66. Winn M., Casey E., Habimana O., Murphy C.D. Characteristic of *Streptomyces griseus* biofilms in continuous flow tubular reactors. FEMS Microbiol Lett. 2014; 352: 2: 157—164.
67. Qureshi N., Annous B.A., Ezeji T.C. et al. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. Microb Cell Fact 2005; 4: 24.
68. Максимова Ю.Г. Микробные биопленки в биотехнологических процессах. Биотехнология 2013; 4: 9—23. / Maksimova Ju.G. Mikrobnye bioplenki v biotechnologicheskikh processah. Biotechnologija 2013; 4: 9—23. [in Russian]
69. Sarkar S., Saha M., Roy D. et al. Enhanced production of antimicrobial compounds by three salt-tolerant actinobacterial strains isolated from the Sundarbans in a niche-mimic bioreactor. Mar Biotechnol (NY) 2008; 10: 5: 518—526.
70. Журина М.В., Стрелкова Е.А., Плакунов В.К., Беляев С.С. Влияние состава реконструированных биопленок на активность парафинокисляющих бактерий. Микробиология 2008; 77: 5: 701—703. / Zhurina M.V., Strelkova E.A., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Vlijanie sostava rekonstruirovannyh bioplenok na aktivnost' parafinokisljajushhih bakterij. Mikrobiologija 2008; 77: 5: 701—703. [in Russian]
71. Morales D.K., Ocampo W., Zambrano M.M. Efficient removal of hexavalent chromium by the toxic effect of metal exposure. Appl Microbiol 2007; 193: 6: 2704—2712.
72. Виноградова К.А., Полторак В.А., Огуаква Д.У. и др. Антибиотики 11—98, выделение и свойства. Антибиотики 1967; 12: 7: 558—564. / Vinogradova K.A., Poltorak V.A., Oguakva D.U. i dr. Antibiotiki 11—98, vydelenie i svojstva. Antibiotiki 1967; 12: 7: 558—564. [in Russian]
73. Виноградова К.А., Кириллова Н.П., Соколова З.Г. и др. О структуре гелиомицина, продуцируемого *Streptomyces heliomycini*, и антибиотика 11—98, продуцируемого *Streptomyces olivocinereus*. Антибиотики 1991; 36: 3: 28—29. / Vinogradova K.A., Kirillova N.P., Sokolova Z.G. i dr. O strukture geliomicina, produciруемого *Streptomyces heliomycini*, i antibiotika 11—98, produciруемого *Streptomyces olivocinereus*. Antibiotiki 1991; 36: 3: 28—29. [in Russian]
74. Виноградова К.А., Соколова З.Г., Степанов А.Л., Кожевина Л.С. Кинетика роста актиномицетов на плотных средах. Микробиология 1983; 52: 2: 249—252. / Vinogradova K.A., Sokolova Z.G., Stepanov A.L., Kozhevina L.S. Kinetika rosta aktinomicetov na plotnyh sredah. Mikrobiologija 1983; 52: 2: 249—252. [in Russian]

75. Кожеева Л.С., Виноградова К.А., Кожевин П.А., Силаев А.Б. Изучение связи роста и морфологической дифференциации с антибиотикообразованием у культур — продуцентов гелиомицина. Антибиотики 1976; 21: 8: 709—714. / Kozhevina L.S., Vinogradova K.A., Kozhevina P.A., Silaev A.B. Izuchenie svyazi rosta i morfologicheskoy differenciacii s antibiotikoobrazovaniem u kul'tur — producentov geliomicina. Antibiotiki 1976; 21: 8: 709—714. [in Russian]
76. Виноградова К.А., Дуда В.И., Моносов Э.З., Васильева Л.С. Локализация антибиотика гелиомицина в колониях и мицелии *Actinomyces variabilis* и *Actinomyces olivocinereus*. Доклады АН СССР 1974; 216: 1: 205—208. / Vinogradova K.A., Duda V.I., Monosov E.Z., Vasil'eva L.S. Lokalizacija antibiotika geliomicina v kolonijah i micelii *Actinomyces variabilis* i *Actinomyces olivocinereus*. Doklady AN SSSR 1974; 216: 1: 205—208. [in Russian]
77. Кожеева Л.С., Виноградова К.А., Струве М.Е. Морфологическая и цитохимическая дифференциация колоний актиномицетов — продуцентов гелиомицина в процессе развития на плотных средах. Биол науки 1982; 8: 88—91. / Kozhevina L.S., Vinogradova K.A., Struve M.E. Morfologicheskaja i citohimicheskaja differenciacija kolonij aktinomicetov — producentov geliomicina v processe razvitiya na plotnyh sredah. Biol nauki 1982; 8: 88—91. [in Russian]
78. Кожеева Л.С., Виноградова К.А. Изучение количественных закономерностей роста актиномицетов — продуцентов гелиомицина на плотных средах в связи с дифференциацией. Вестник МГУ 1982; 16: 4: 44—46. / Kozhevina L.S., Vinogradova K.A. Izuchenie kolichestvennyh zakonov rosta aktinomicetov — producentov geliomicina na plotnyh sredah v svyazi s differenciaciej. Vestnik MGU 1982; 16: 4: 44—46. [in Russian]
79. Соколова З.Г., Виноградова К.А., Артюхова В.И. Влияние концентрации глюкозы на рост и морфологию колоний стрептомицетов на плотных средах. Вестник МГУ 1985; 16: 1: 61—66. / Sokolova Z.G., Vinogradova K.A., Artyukhova V.I. Vlijanie koncentracii gljukozy na rost i morfologiju kolonij streptomicetov na plotnyh sredah. Vestnik MGU 1985; 16: 1: 61—66. [in Russian]
80. Звягинцев Д.Г., Виноградова К.А., Ефременкова Л.М. Прямое микроскопическое выявление в почве актиномицета-продуцента люминесцирующего антибиотика. Микробиология 1976; 45: 2: 337—341. / Zvjagincev D.G., Vinogradova K.A., Efremenkova L.M. Prjamoe mikroskopicheskoe vyjavlenie v pochve aktinomiceta-producenta ljuminescirujushhego antibiotika. Mikrobiologija 1976; 45: 2: 337—341. [in Russian]
81. Raaijmakers J.M., Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. Ann. rev. of Phytopathol 2012; 50: 403—424.
82. Кожевин П.А., Виноградова К.А., Булгакова В.Г. Почвенная антибиотическая резистомы. Вестник МГУ 2013; 17: 2: 3—10. / Kozhevina P.A., Vinogradova K.A., Bulgakova V.G. Pochvennaja antibioticheskaja rezistoma. Vestnik MGU 2013; 17: 2: 3—10. [in Russian]
83. Hansen L.H., Ferrari B., Sorensen S.J. Detection of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in soil microcosms by combining whole-cell biosensor and flow cytometry. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 1: 239—244.
84. Виноградова К.А., Ефременкова Л.М., Звягинцев Д.Г. Определение антибиотической активности почвенных актиномицетов — продуцентов антибиотиков в местах их непосредственного обитания. Сб. «Биологическая диагностика почв». М.: Наука, 1976; 51—52. / Vinogradova K.A., Efremenkova L.M., Zvjagincev D.G. Opredelenie antibioticheskoy aktivnosti pochvennyh aktinomicetov — producentov antibiotikov v mestah ih neposredstvennogo obitanija. Sb. «Biologicheskaja diagnostika pochv». M.: Nauka, 1976; 51—52. [in Russian]
85. Ефременкова Л.М., Виноградова К.А., Звягинцев Д.Г. Распространение и развитие *Actinomyces olivocinereus* в почвах разных типов. Сб. «Биологическая диагностика почв». М.: Наука, 1976; 92—93. / Efremenkova L.M., Vinogradova K.A., Zvjagincev D.G. Rasprostranenie i razvitie *Actinomyces olivocinereus* v pochvah raznyh tipov. Sb. «Biologicheskaja diagnostika pochv». M.: Nauka, 1976; 92—93. [in Russian]
86. Ефременкова Л.М., Кожевин П.А., Виноградова К.А., Звягинцев Д.Г. Изучение динамики популяции *Streptomyces olivocinereus* в почве. Микробиология 1978; 47: 5: 871—875. / Efremenkova L.M., Kozhevina P.A., Vinogradova K.A., Zvjagincev D.G. Izuchenie dinamiki populjacji *Streptomyces olivocinereus* v pochve. Mikrobiologija 1978; 47: 5: 871—875. [in Russian]
87. Виноградова К.А., Петрова Л.И., Соколова З.Г. Распространение бурых актиномицетов в почвах СССР. Биологические науки. Сер. почвоведение 1971; 4: 122—125. / Vinogradova K.A., Petrova L.I., Sokolova Z.G. Rasprostranenie buryh aktinomicetov v pochvah SSSR. Biologicheskie nauki. Ser. pochvovedenie 1971; 4: 122—125. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

Булгакова Вера Георгиевна — к. б. н., старший научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

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

Вакцинопрофилактика пневмококковых инфекций нижних дыхательных путей у взрослых без иммуносупрессии

И. А. ГУЧЕВ

Vaccinal Prevention of Lower Respiratory Tract Pneumococcal Disease in Adults Without Immunosuppression

I. A. GUCHEV

Внебольничная пневмония (ВП) по-прежнему остается одной из ведущих проблем мирового здравоохранения. Пневмококковая инфекция возглавляет перечень заболеваний, которые можно предотвратить вакцинацией, ответственных за наибольшее число смертей во всем мире как у детей, так и у взрослых. Для профилактики пневмококковых инфекций и ВП у взрослых 18 лет и старше широко применяют 2 препарата — неконъюгированную полисахаридную вакцину ППВ-23 и конъюгированную 13-валентную пневмококковую вакцину ПКВ-13. В данном обзоре рассмотрены результаты ряда исследований и мета-анализов эффективности ППВ-23 и ПКВ-13 как средств профилактики инвазивных инфекций и неинвазивных ВП у взрослых без нарушений функций иммунной системы. Учитывая неопределённость результатов мета-анализов и отсутствие убедительных доказательств эффективности ППВ-23 как эффективного средства профилактики ВП у лиц с хронической патологией, не связанной с нарушением иммунитета, всё больше стран переходят на сочетанное применение ПКВ-13 и ППВ-23 с приоритетным применением конъюгированной вакцины для реализации программ по иммунизации лиц групп риска и старшего возраста. В условиях, когда в РФ массовая кампания по иммунизации детей первых лет жизни с применением ПКВ-13 только началась, ожидать актуализации дополнительных серотипов пневмококка, не включённых в состав конъюгированной вакцины преждевременно, в связи с чем риск-возрастная стратегия вакцинации взрослых должна быть основана на приоритетном применении ПКВ-13.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, пневмококковая инфекция, вакцинация, пневмококковая конъюгированная вакцина, пневмококковая полисахаридная вакцина.

Community-acquired pneumonia (CAP) remains one of the major healthcare problems globally. Pneumococcal disease is the leading cause of deaths among vaccine preventable diseases in children and adults. Plain polysaccharide vaccine PPSV-23 and conjugated pneumococcal polysaccharide vaccine PCV-13 are widely used to prevent pneumococcal disease and CAP in adults without immunosuppression. The review concerns the results of trials and meta-analysis of PPSV-23 and PCV-13 effectiveness in invasive pneumococcal disease (IPD) and CAP prevention in immunocompetent adults. More and more expert immunization committees in different countries are taking into consideration uncertain effectiveness of PPSV-23 in CAP prevention in immunocompetent adults, and recommend the PCV-13 priority use for mass immunization campaigns in high-risk groups and elder population. Since the Russian Federation has started the PCV-13 vaccination campaign for early childhood only at the end of 2014, the anticipated serotype replacement should not be taken into consideration at the moment across all the age groups, and therefore the risk and age based approach to adult vaccination should be used with the PCV-13 priority.

Key words: community-acquired pneumonia, pneumococcal disease, vaccination, pneumococcal conjugate vaccine, pneumococcal polysaccharide vaccine.

«Эпоха тысячелетнего преобладания лечебной медицины завершается и наступает эра профилактической медицины»

Sigerist HE. Socialized Medicine in the Soviet Union, New York, NY: W. W. Norton; 1937)

Внебольничная пневмония (ВП), в том числе осложнённая инвазией пневмококка (ИПИ), вносит существенный вклад в структуру инфекционной и общей заболеваемости.

© И. А. Гучев, 2016

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

Данные зарубежных стран указывают на заболеваемость ВП среди взрослых на уровне не менее, чем 5—10 случаев на 1000 лиц взрослого населения [1]. При экстраполяции на РФ ежегодный уровень заболеваемости составляет более 1,5 млн человек, из которых примерно 400 тыс подлежат госпитализации. Кроме того, у 40 тыс пациентов развитие ВП завершается летальным исходом [2]. Особенно актуальна проблема ВП для организованных военных коллективов, где показатель заболеваемости достигает 49—200‰ [3—5].

Streptococcus pneumoniae — основной возбудитель ВП и её осложнений. Вирулентность, склон-

ность к инвазии и рост устойчивости к антибактериальным препаратам (АМП) требуют периодического пересмотра подходов к терапии и профилактике заболеваний, вызванных данным микроорганизмом. В XXI веке, когда распространение устойчивых к АМП возбудителей приобрело высокую значимость, а новых АМП практически не появляется, важное значение приобретают превентивные меры, в частности иммунопрофилактика. С этой целью используют два типа пневмококковых вакцин: неконъюгированные (ППВ) и конъюгированные (ПКВ). Клинические и эпидемиологические исследования, иммунологические свойства препаратов свидетельствуют об очевидном преимуществе последних.

Сравнению различных противопневмококковых вакцин как средств профилактики ВП и ИПИ у лиц без врождённой или приобретённой иммуносупрессии посвящён настоящий обзор.

Этиология инфекций нижних дыхательных путей

Внебольничная пневмония. Исследования, проводимые в течение многих лет неизменно свидетельствуют о ведущей роли пневмококка как возбудителя бактериальных ВП. Пневмококк и *Streptococcus pyogenes*, реже *Staphylococcus aureus* являются основной причиной летальных исходов при ВП на фоне гриппа. Изучение этиологии ВП у взрослого населения в РФ определило роль пневмококковой ВП на уровне 20%; показатель возростал до 26% у лиц с тяжёлым течением заболевания и до 38% при ВП, завершившейся летальным исходом [6]. Заслуживает внимания работа Н. В. Иванчик и др., изучившими 57 патологоанатомических случаев ВП [7]. Основными возбудителями фатальных ВП являлись *Klebsiella pneumoniae* (31%), *Staphylococcus aureus* (29%), *S. pneumoniae* (13%) и *Haemophilus influenzae* (11%); средний возраст умерших (65% мужчины) — $51,1 \pm 14,5$ лет.

Преобладание пневмококка (12—85%) у взрослых пациентов с ВП подтверждено в мета-анализах, проведённых М. А. Said и соавт. [8], М. Н. Rozenbaum и соавт. [1] и в обзоре литературы А. Тоггес и соавт. [9]. Высока роль проведённых микроорганизма и у военнослужащих РФ, где, во время вспышек ВП, он выявлялся в 35% случаев [5, 10]. Особое значение инфекция, в том числе инвазивная пневмококковая (ИПИ) ВП приобретает у лиц пожилого возраста [11, 12], а также при наличии двух и более хронических заболеваний [13].

Иммунопрофилактика

В Российской Федерации заявление о новой политике в сфере профилактики пневмококко-

вых инфекций озвучено 26.04.14 г., когда вакцинация детей первых лет жизни была введена в Национальный календарь профилактических прививок. Также пневмококковая вакцинация детей 2—5 лет, взрослых из групп риска и лиц, подлежащих призыву на военную службу, была включена в Календарь прививок по эпидемическим показаниям, а в 2015 г. и опубликованы Федеральные клинические рекомендации «Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции» [14].

Иммуногенность пневмококковых вакцин. Антигены 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины являются Т-независимыми и способны напрямую активировать В-лимфоциты. В результате формируется разная продолжительности и степени выраженности серотип-специфичный гуморальный иммунный ответ, преимущественно за счёт низкоафинного IgG2 [15, 16].

13-валентная конъюгированная пневмококковая вакцина обеспечивает опосредованную активацию В-лимфоцитов через антиген-презентирующие клетки и Т-клеточное звено с участием хелперных клеток. В ходе Т-опосредованной дифференцировки В-лимфоцитов синтезируются антитела IgG1 и IgG3 с более высокой афинностью, чем IgG2. Благодаря активации такого механизма иммунного ответа обеспечивается эффективная защита пациентов с сопутствующей патологией [17—19].

Серотипы пневмококка и их значение для разработки и обоснования муниципальных программ иммунизации. Одной из основ разработки программ вакцинации является оценка соответствия состава вакцин серотипам, преобладающим среди целевых групп населения на конкретной территории.

Изучение циркулирующих в РФ серотипов *S. pneumoniae* проводится с начала XXI века, главным образом среди детей и военнослужащих по призыву. В работах авторских коллективов, определивших распространение серотипов (СТ) во взрослой популяции, показано, что наиболее характерными СТ являются, в порядке убывания: 19A/F, 3, 23F, 6, 14 и 23A [20–24]. Значительно реже (<5%) встречаются 9V/A, 10A и 15F [21]. Ситуация не меняется и при рассмотрении по регионам. Так, для Среднего Урала актуальны СТ 3 (15%), 6A/B/C (26%), 15A/F (18%), 19A (15%), 19F (18%) [23], для Дальневосточного региона — 19F, 3, 6A, 9V, 14, 15B/C, 18C и 23F [20]. Различия между 13- и 23-валентными вакцинами по степени «перекрытия» преобладающих клинических серотипов, как правило, не превышает 5% [20, 21, 25–27]. Из этого следует исходить при решении вопроса о выборе иммунобиологического препарата.

Можно ли полагаться на российские исследования или незначительное различие между

вакцинами всего лишь ошибка малых выборок? Для разрешения вопроса приведём данные южнокорейских исследователей, полученные при анализе СТ пневмококка, выделенных у 919 пациентов с ВП, как бактериемической (2%), так и небактериемической¹ [28]. По сравнению с ПКВ-13, ППВ-23 обеспечила незначимое — 3% преимущество.

До внедрения массовой иммунизации детей с применением ПКВ-13 в Испании перевес в пользу ППВ-23 при ИПИ у лиц старше 65 лет составлял 6% (63% vs. 69%) [29, 30]. Если же средний возраст пациентов превышал 70 лет, перевес в пользу ППВ-23 достиг 20%. Однако незначительное количество выделенных изолятов (28 инвазивных и респираторных штаммов) не позволяет достоверно судить о существенном различии [31].

Резистентность, инвазивный потенциал и связь серотипов с тяжестью клинических проявлений. Касаясь вопросов резистентности, следует отметить, что наиболее часто данный феномен встречается среди входящих в состав вакцин СТ 19А, 19F, 14 и 6. Подобная картина, по крайней мере, отмечена в детской популяции и соответствует международным данным, определившим 6А, 6В, 9V, 14, 15А, 19А, 19F и 23F как основные, резистентные к АМП, серотипы [25]. Согласно данным, полученным в странах с длительным опытом иммунизации ПКВ и ППВ, только применение ПКВ, но не ППВ, обеспечивает сокращение ИПИ, вызванных антибиотикоустойчивыми пневмококками [32, 33]. Более того, массовая иммунизация ПКВ способна обеспечить снижение потребления АМП — фактора риска селекции резистентных стрептококков [34].

Рассматривая проблему инвазивных инфекций, следует подчеркнуть отсутствие безусловного равенства между инвазивным потенциалом и тяжестью инфекционного процесса. Показано, что риск тяжёлого течения и осложнений при пневмококковой инфекции характерен для СТ 1, 3 и 19А [35]. В частности, с распространённым в РФ СТ 3 чаще всего связано развитие тяжёлой ВП, эмпиемы плевры и септического шока [25, 26, 36, 37]. Ассоциация серотипов 3, 6А/В, 9N и 19F с летальными исходами выявлена и в мета-анализе 2010 г. С другой стороны, такие СТ, как 1, 7F и 8, определяли благоприятный прогноз при ИПИ [38].

Благодаря эффекту коллективной защиты, достигаемому при высоком уровне охвата новорождённых, у взрослого населения происходит

частичная элиминация вакцинных СТ, по некоторым наблюдениям и проблемного СТ 3 [39—41]. Значимое замещение не-ПКВ-13 СТ происходят не ранее, чем через три года после начала массовой иммунизации детей [42]. На этом фоне отмечен прирост менее инвазивных СТ [43—45], как правило, не вызывающих серьёзных осложнений [41, 45, 46].

Клинические показатели оценки эффективности вакцин. Эффективность вакцинации у взрослых оценивается по ряду конечных клинико-эпидемиологических показателей. К ним относится потенциал вакцин в отношении:

1. Профилактики назофарингеального носительства (НФН) у детей и особых категорий взрослых (включая военнослужащих).

2. Предотвращения развития ИПИ.

3. Предотвращения развития неинвазивных инфекций.

4. Защиты лиц с хронической сопутствующей патологией.

Такие лабораторные показатели, как индуцированный синтез серотип-специфичных антител и их опсонизирующая активность, являются суррогатными маркерами эффективности, не всегда отражающими реальный защитный потенциал вакцин.

Профилактика назофарингеального носительства и коллективная защита. Формирование коллективной защиты через уменьшение частоты НФН является свойством исключительно конъюгированных вакцин. Это преимущество, учитывая патогенетическую роль НФН в формировании ИДП, актуально в группах, для которых характерен повышенный риск пневмококковых инфекций. Для предотвращения НФН необходима антигенная стимуляция CD4+ Th17 лимфоцитов, обеспечивающих фагоцитарный клеточный ответ [47—49]. Оценивая последствия снижения плотности НФН вирулентных СТ, следует учитывать высокую степень ассоциации НФН с тяжёлыми осложнениями гриппа А/Н1N1 [50]. Данный факт предполагает возможность сокращения осложнений при снижении плотности НФН.

Профилактика инвазивной пневмококковой инфекции

Инвазивная пневмококковая инфекция наиболее часто встречается у лиц пожилого возраста, пациентов с тяжёлой сопутствующей патологией и лиц с иммуносупрессивными состояниями.

ПКВ-13. Для изучения эффективности вакцины у лиц пожилого возраста (65 лет и старше) с

¹ Ретроспективный анализ госпитализаций 2007—2011 гг. При низкой 2% частоте ИПИ 30-суточная летальность не отличалась от традиционно констатируемых 11%.

хронической патологией было проведено рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование CAPiTA с участием свыше 84 тыс. добровольцев. Исследование проводили в Нидерландах, исходя из следующих соображений:

- 1) электронная документация на пациентов позволяла быстро отслеживать;
- 2) не проводили массовых кампаний по вакцинации;
- 3) рутинно не применялась ППВ23 [51–53].

Было доказано, что ПКВ-13 обеспечивает снижение частоты ИПИ, вызванных вакцинным штаммом *S.pneumoniae*, на 75%. Эффект не снижается при хронической патологии, но, возможно, изменяется при иммуносупрессии. Не выявлено влияния ПКВ-13 на общую летальность. Эффективность ПКВ оценена также в мета-анализе Н. Ewald [54], ответившего на вопрос: «эффективна ли ПКВ как средство снижения летальности, профилактики ИПИ, ВП и ОСО вне зависимости от возраста, иммунного статуса и страны исследования». Согласно расчёту, конъюгированные вакцины оказали существенное и достоверное влияние на сокращение частоты ИПИ (ОШ 0,43 [95% ДИ 0,36–0,51]), причём в большей мере ИПИ, вызванных вакцинным серотипом (ОШ 0,27 [0,22–0,34]).

ППВ-23. В последние 7 лет было выполнено несколько мета-анализов, задача которых заключалась в ответе на вопросы:

- 1) снижает ли ППВ-23 риск развития ИПИ;
- 2) снижает ли ППВ-23 риск развития неинвазивной ВП, в том числе вызванной включёнными в препарат серотипами пневмококка;
- 3) снижает ли ППВ-23 летальность при ВП любой этиологии.

В работах авторских коллективов S. Moberley [55], C. Cadeddu [56] и A. Huss [57] был сделан вывод об эффективности вакцины как средства профилактики ИПИ у лиц без нарушений функций иммунной системы. В мета-анализе S. Moberley и соавт. [55], включившем 18 рандомизированных контролируемых (РКИ) ($n=64\,852$) и 7 нерандомизированных ($n=62\,294$) исследований риск ИПИ был значительно ниже у вакцинированных (ОР 0,26 [95% ДИ 0,14–0,45]). Авторами подчёркнуто, что иммунизация ППВ, как и ПКВ-13, не приводит к снижению общей летальности. Также заявлено о невысокой эффективности ППВ как средства профилактики ИПИ у лиц с сопутствующими хроническими заболеваниями.

Если касаться части мета-анализа, оценившей нерандомизированные исследования, то можно отметить двукратное сокращение ИПИ (ОР 0,48 [95% ДИ 0,37–0,61], $I^2 = 31\%$). По таким показателям, как вызванная включёнными в вак-

цину серотипами небактериемическая пневмококковая ВП, ИПИ и бактериемическая пневмококковая ВП, продемонстрирована 73, 82 и 87% эффективность. Сравнимая с продемонстрированной в исследовании CAPiTA эффективностью ПКВ-13, эффективность ППВ-23 показана также в мета-анализе Н. Kraicer-Melamed и соавт. [58]. На основании 6 исследований «хорошего» качества (3 — когортные, 3 — случай-контроль) ППВ-23 у лиц старше 65 лет обеспечивает 60% защиту от ИПИ, вызванной любым серотипом пневмококка — 58% [95% ДИ: 23–77%] и 62% [95% ДИ: 36–77%] соответственно. Для сравнения, в исследовании CAPiTA эффективность ПКВ-13 по данному показателю, но не только у лиц без сопутствующей патологии как это характерно для ППВ-23, составила 48,5% [95% ДИ: 20,9–67,0%]. Данная 10% разница, скорее всего, является отражением различий между циркулирующими в различных странах серотипами пневмококка.

Данные о сокращении частоты ИПИ в краткосрочной перспективе также приводятся в исследовании CAPAMIS, включившем 27 204 лиц старше 65 лет, проживающих в Южной Каталонии (Испания) [59]. Коэффициент риска (hazard ratio) бактериемической пневмококковой ВП составил 0,38 [95% ДИ 0,09–1,68]. Более выраженный профилактический эффект наблюдался у женщин.

В 2016 г. стали доступны результаты долгосрочного наблюдения за взрослыми, привитыми ППВ в Великобритании — стране, широко использующей вакцинацию детей ПКВ. Здесь программа иммунизации детей первых 2 лет жизни ПКВ-7 была начата в 2002 г., достигла 75% охвата в 2007 г. и 98% — в 2009 г. Охват пожилого населения ППВ-23 в 2007–2009 гг. составлял 70%. В то же время, ПКВ у взрослых в данной стране практически не используется в связи с высокой стоимостью. Оценивая результаты, J. Elston и соавт. отмечают недостоверный — с 40 до 45% прирост ИПИ и достоверный прирост госпитализаций с ВП у лиц старше 65 лет [60], что, кстати, отчасти противоречит данным раннего исследования [61]. Вскоре после начала массовой иммунизации новорождённых в 2006 г. среди детей и взрослых наблюдалось сокращение ИПИ, вызванных ПКВ-7 серотипами (с 52 до 12%). Одновременно зафиксирован прирост ИПИ, ассоциированных с ППВ-23 (с 39 до 69%, $p<0,05$) и невакцинными серотипами (с 9 до 19%, $p=0,26$). В итоге эффективность ППВ-23 определена как недостоверная, составив 15% (95% ДИ от -4,6 до 31%). Не подтверждена эффективность ППВ-23 и в плане предотвращения ВП. Проанализировав аналогичный временной период, N. Andrews с соавт. констатировали сокращение риска ИПИ только в первые два года после иммунизации [62]. В последующем, с 3-го

по 5-й год, защитное действие постепенно исчезало, в отличие от сохраняющегося более 4 лет стабильного эффекта ПКВ-13 [53].

Профилактика неинвазивных пневмококковых инфекций

В отличие от ИПИ, где уровень защиты определяется сывороточной концентрацией антител, предотвращение неинвазивных инфекций не столь очевидно коррелирует с указанным показателем. Эрадикация бактерий, локализованных на поверхности эпителия, в большей степени определяется активностью фагоцитов (нейтрофилов и мононуклеаров, альвеолярных макрофагов), стимулируемых посредством Т-клеточного звена иммунитета. Локальный иммунный ответ (иммунитет слизистых оболочек), необходимый для «защиты» от колонизации и инвазии пневмококка, ППВ-23 в достаточной мере не индуцируется.

ПКВ-13. Потенциал предотвращения неинвазивной ВП отражён в исследовании CAPiTA [51–53]. Вакцинация ПКВ-13 на 46% снизила риск ВП, вызванной включёнными в состав вакцины серотипами (NNV для предотвращения 1 случая ВП, вызванной вакцинным СТ = 634; 95% ДИ 386 — 1675 [63]). Эффект наблюдался также при сопутствующей хронической патологии без выраженной иммуносупрессии [52]. С другой стороны, ПКВ-13 не влияла на развитие как ВП любой этиологии (95% ДИ от -5,1% до 14,2%; $p=0,32$), так и неинвазивной пневмококковой ВП, вызванной любыми серотипами пневмококка (95% ДИ от -5,7% до 45,8%; $p=0,11$). Не было отмечено также эффекта снижения общей летальности. В противоположность исследованию CAPiTA, мета-анализ Н. Ewald [54] продемонстрировал достоверное — 7% сокращение «всех случаев ВП» (ОР 0,93 [0,89–0,97]), в том числе «любой пневмококковой ВП» на 22% (ОР 0,78 [0,62–0,97]).

ППВ-23. В ряде современных руководств по иммунизации, а также в инструкции по медицинскому применению ППВ-23 рекомендована как средство профилактики ИПИ у лиц с сопутствующей патологией, а также у лиц старше 50–65 лет (в зависимости от решения локальных советов по иммунизации и только после введения ПКВ-13). В то же время, организаторов здравоохранения и практикующих врачей интересует потенциал вакцины в плане профилактики неинвазивной пневмококковой ВП.

Большинство проспективных исследований и мета-анализов ставят под сомнение целесообразность применения ППВ-23 для решения последней цели в развитых странах [55–57]. В частности, мета-анализ S. Moberley [55], хотя и указывает на возможность положительного эффекта (эффективность в отношении ВП, вызванной вакцин-

ным серотипом составляет 73%), однако подчеркивает, что эффект наблюдался исключительно в ретроспективных исследованиях, выполненных в развивающихся странах с низким уровнем жизни и высоким, не характерным для развитых стран, уровнем заболеваемости ВП.

Отсутствие защитного эффекта ППВ-23 у лиц старше 60 лет было продемонстрировано в мета-анализе 6 РКИ, 4 из которых оценивали шанс развития пневмококковой ВП [64]. Авторами констатирована крайне высокая гетерогенность исследований ($I^2 = 78\%$, $p = 0,004$) за счёт выпадающего исследования Т. Maгууама и соавт. [65]. Данный показатель (гетерогенность), как известно, препятствует переносу выводов на общую популяцию [64]. В связи с этим, был выполнен субанализ гомогенных групп, подтвердивший, что ППВ-23 [66] не может рассматриваться как вмешательство, способствующее сокращению риска пневмококковой ВП. Примерно такие же выводы были получены при оценке текста мета-анализа семи проспективных исследований ($n=1566010$, включены лица старше 19 лет с сопутствующей патологией, лица старше 65 лет без иммуносупрессии и здоровые военнослужащие) [67]. Согласно субанализу 3 из 7 исследований ($n=2293$), ППВ-23 достоверно (ОР 0,54 [0,18–1,65 $p=0,01$]) сокращает риск развития пневмококковой ВП. Однако широкий доверительный интервал и крайне высокая гетерогенность ($I^2 = 77\%$) исследований делает представленный вывод о положительном влиянии ППВ-23 мало убедительным.

Потенциал ППВ-23 как средства профилактики неинвазивной ВП изучен в работах, не нашедших отражения в мета-анализах. В частности, Т. L. Wiemken и соавт. оценили итоги вакцинации лиц старше 65 лет [68]. Основной точкой интереса являлось влияние препарата на риск госпитализации с диагнозом «пневмококковая ВП». На выборке из 2688 госпитализированных с ВП пациентов показана 37% [95% ДИ 10–55%] эффективность вакцины. Не распространяющийся на мужчин (34% [95% ДИ от -1 до 57%], $p=0,06$) профилактический эффект был обусловлен исключительно женской группой (68% [95% ДИ 40–83%], $p=0,001$). Следует вспомнить, что последняя значительно лучше «отвечает» синтезом антител на антигенную стимуляцию [69].

Анализируя цитируемую работу, попробуем выявить особенности, позволяющие определить причину положительного результата. В частности, у 35% пациентов, госпитализированных с пневмококковой пневмонией, была выявлена инвазивная ВП, при которой профилактический эффект ППВ-23 довольно высок. Во внимание следует принимать еще одну особенность исследования [68]. Согласно анамнезу, у мужчин чаще, чем среди женщин, выявлялись ХОБЛ и заболе-

вания почек с ХПН. В то же время известно, что сочетание двух и более хронических заболеваний (перечисленных выше, а также сердечной недостаточности, курения, ожирения и сахарного диабета) является не менее значимым, чем иммуносупрессия, фактором риска ИПИ и пневмококковой ВП, особенно у лиц пожилого возраста [13, 70]. Таким образом, отсутствие эффекта в группе мужчин поддерживает выводы мета-анализов и обзоров [55–58], указывающих на сомнительный потенциал ППВ-23 у пожилых лиц мужского пола с сопутствующей патологией.

Профилактический эффект ППВ-23 был продемонстрирован в рамках испанского исследования SARAHIS [59]. При субанализе выделенных из исследуемой популяции лиц коэффициент риска развития небактериальной пневмококковой ВП составил 0,52 [0,29–0,92], любой пневмококковой ВП — 0,49 [0,29–0,84] и, наконец, любой ВП — 0,75 [0,58–0,98]. Наиболее выраженный эффект по показателю «госпитализация с пневмококковой ВП» был отмечен среди женщин. Выявленный широкий диапазон достоверных интервалов, как известно, снижает возможность переноса результата на популяцию. Важно отметить и то, что при первичном анализе привитой когорты влияние ППВ-23 на частоту развития бактериальной и небактериальной пневмококковой пневмонии не было подтверждено. Не установлено и влияния вакцины на риск развития любой ВП, а также на летальность как при ВП, так и по любой причине.

И наконец, подтверждение незначительного потенциала ППВ-23, равно как и ПКВ-13, получено в мета-анализе H.Kraicer-Melamed и соавт. [58]. Доказано отсутствие влияния вакцин на развитие у пожилых ВП, вызванной «любым возбудителем». В то же время, следует учитывать возможный факт влияния вакцин, в частности ППВ-23, на сокращение случаев тяжёлой ВП, как известно, часто вызванной включёнными в рассматриваемые вакцины высоковирулентными, инвазивными и резистентными к АМП серотипами *S.pneumoniae* [61].

Организационные выводы

Неопределённость относительно эффективности ППВ-23 на фоне выявленных и достоверно подтверждённых преимуществ ПКВ-13 оказала влияние на принятие экспертных решений о вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции. Консультативный комитет по иммунизации США (ACIP), продолжая поддерживать

применение ППВ-23, объясняет это дополнительным (+38%), перекрытием циркулирующих на территории США серотипов, отсутствующих в ПКВ-13 [41, 71, 72]. Однако ACIP, в отличие от британских экспертов [73], не раскрывает важный аспект, касающийся экономической составляющей.

Известно, что в США и Великобритании, в отличие от РФ, разница в стоимости вакцин существенна². Вероятно это различие и способствовало сохранению позиций ППВ-23 в США и ряде других стран. Однозначно сыграла свою роль и потребность в дополнительном перекрытии циркулирующих СТ, не включённых в состав ПКВ-13, что обусловлено успехом массовых кампаний по вакцинации детей с применением ПКВ-7 и затем ПКВ-13 с 2000 года (в США).

Противоречивость получаемых результатов не могла не повлечь за собой пересмотра тактики вакцинации в развитых странах. Решением российских [14], южнокорейских [74], американских [71], бельгийских [75], датских [76], люксембургских [77], португальских [78] и других экспертов [66] вакцинация ПКВ-13 рассматривается как обязательная у лиц старше 50–65 лет. В таких странах, как Россия [14], Австрия [79], Дания [76], Люксембург [77] и Южная Корея [43] рекомендована первичная иммунизация ПКВ-13 у детей и лиц с 18 до 50–65 лет, имеющих сопутствующую патологию (рисково-возрастная стратегия), в том числе хронические заболевания органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, печени, почек и сахарный диабет.

Согласно современному подходу, введение ПКВ-13 должно всегда предшествовать применению ППВ-23 [14, 71, 72, 80]. С целью безопасного достижения эффекта бустеризации, после применения ПКВ-13 введение ППВ-23 следует проводить не ранее чем через 1 год — 5 лет (от 8 нед в группе высокого риска в случае острой необходимости защиты от ИПИ, вызванных дополнительными серотипами). Предложение о дополнительной ревакцинации ППВ-23 отражает характерную для США ситуацию, связанную с длительным применением ПКВ и распространением замещающих серотипов [41, 72]. Однако и в этом случае, вероятно, не следует ожидать снижения частоты ИПИ, вызванных специфичными только для ППВ-23 СТ [40, 60].

И наконец, переход на «рисковую» вакцинацию с приоритетом ПКВ-13 предложен в рекомендациях европейских экспертов [81]. По их мнению, лицам до 65 лет, имеющим сопутствующую патологию (группа риска и группа высокого

² Контрактная стоимость 1 дозы ПКВ-13 для госзакупок/частного сектора в США — \$96,13/\$159,57. Стоимость ППВ — 23 \$26,15/\$78,90 (<http://www.cdc.gov/vaccines/programs/vfc/awardees/vaccine-management/price-list/>). В РФ контрактная стоимость закупки ПКВ-13, согласно результатам состоявшихся аукционов, чаще ниже стоимости ППВ-23.

риска), рекомендована первичная иммунизация ПКВ-13 с «возможной» ревакцинацией ППВ-23. Аналогичный подход предложен для лиц пожилого возраста, где введение ППВ-23 не может предшествовать иммунизации ПКВ-13. В цитируемом документе не отвергается возможность первичной иммунизации ППВ-23, но только в случае отсутствия ПКВ-13. В подобной ситуации ППВ-23 применяется в 2 ситуациях: 1) у лиц старше 75 лет, 2) у пациентов 65–75 лет, входящих в группу высокого риска по развитию ИПИ.

Заключение

Оценивая возможность профилактики пневмококковой инфекции у лиц старше 18 лет, необходимо отметить более высокий защитный потенциал конъюгированных вакцин. Стимуляция иммунитета по Т-зависимому пути с формированием иммунологической памяти, доказанный эффект коллективной защиты, сокращение частоты ИПИ и неинвазивных пневмококковых инфекций, снижение риска инфекции, вызванной устойчивым к АМП серотипом пневмококка, а также потенциал сокращения потребления АМП [34], подтверждает преимущество ПКВ-13.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rozenbaum M.H., Pechlivanoglou P., van der Werf T.S., Lo-Ten-Foe J.R., Postma M.J., Hak E. The role of *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia among adults in Europe: a meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32 (3): 305–316. doi: 10.1007/s10096-012-1778-4. PubMed PMID: 23242464.
2. Chuchalin A.G. Pneumonia: the urgent problem of 21st century medicine. *Ter Arkh* 2016; 88 (3): 4–12. PubMed PMID: 27191017.
3. Guchev I.A., Gray G.C., Klochkov O.I. Two regimens of azithromycin prophylaxis against community-acquired respiratory and skin/soft-tissue infections among military trainees. *Clin Infect Dis* 2004; 38 (8): 1095–1101. PubMed PMID: 15095213.
4. Николенко Е.Е. Внебольничные пневмонии у военнослужащих: проблемы и пути их решения. *Здоровье. Мед экол. Наука* 2015; 59 (1): 66–69. / Nikolenko E.E. Vnebol'nicnye pnevmonii u voennosluzhashih: problemy i puti ih resheniya. *Zdorov'e. Med jekol. Nauka* 2015; 59 (1): 66–69. [in Russian]
5. Жоголев С.Д., Огарков П.И., Жоголев К.Д., Иванников Ю.Г., Шипицын К.С., Колесников В.В. et al. Эпидемиология и профилактика внебольничной пневмонии у военнослужащих. *Военно-мед журн* 2013; 334 (11): 55–60. / Zhogolev S.D., Ogarkov P.I., Zhogolev K.D., Ivannikov Ju.G., Shipitsyn K.S., Kolesnikov V.V. et al. Jepidemiologija i profilaktika vnebol'nicnoi pnevmonii u voennosluzhashhih. *Voenno-med zhurn* 2013; 334 (11): 55–60. [in Russian]
6. Биличенко Т.Н., Аргунова А.Н., Антонова О.А., Соловьев К.И., Гладин С.А., Никитина Н.Н. др. Частота пневмококковой пневмонии у взрослых больных терапевтических стационаров на трех территориях Российской Федерации. *Пульмонология* 2013; 4: 29–36. / Bilichenko T.N., Argunova A.N., Antonova O.A., Solov'ev K.I., Gladin S.A., Nikitina N.N. dr. Chastota pnevmokokkovoj pnevmonii u vzroslyh bol'nyh terapevticheskikh stacionarov na treh territorijah Rossijskoj Federacii. *Pul'monologija* 2013; 4: 29–36. [in Russian]
7. Иванчик Н.В., Козлов С.Н., Рачина С.А., Кречикова О.И., Синятникова Т.М. Антибиотикорезистентность возбудителей фатальных внебольничных пневмоний у взрослых. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2008; 10 (4): 368–80. / Ivanchik N.V., Kozlov S.N., Rachina S.A., Krechikova O.I., Sinjatnikova T.M. Antibiotikorezistentnost' vozбудitelei fatal'nyh vnebol'nicnyh pnevmonii u vzroslyh. *Klin mikrobiol antimikrob himioter* 2008; 10 (4): 368–80. [in Russian]
8. Said M.A., Johnson H.L., Nonyane B.A., Deloria-Knoll M., O'Brien K.L., Team A.A.P.B.S. et al. Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60273. doi: 10.1371/journal.pone.0060273. PubMed PMID: 23565216; PubMed Central PMCID: PMC3615022.
9. Torres A., Blasi F., Peetermans W.E., Viegi G., Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33 (7): 1065–1079. doi: 10.1007/s10096-014-2067-1. PubMed PMID: 24532008; PubMed Central PMCID: PMC4042014.
10. Guchev I.A., Yu V.L., Sinopalnikov A., Klochkov O.I., Kozlov R.S., Strachounski L.S. Management of nonsevere pneumonia in military trainees with the urinary antigen test for *Streptococcus pneumoniae*: an innovative approach to targeted therapy. *Clin Infect Dis* 2005; 40 (11): 1608–1616. doi: 10.1086/429919. PubMed PMID: 15889358.
11. Bruns A.H., Oosterheert J.J., Cucciolillo M.C., El Moussaoui R., Groenwold R.H., Prins J.M. et al. Cause-specific long-term mortality rates in patients recovered from community-acquired pneumonia as compared with the general Dutch population. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 (5): 763–768. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03296.x. PubMed PMID: 20807226.
12. Montull B., Menendez R., Torres A., Reyes S., Mendez R., Zalacain R. et al. Predictors of severe sepsis among patients hospitalized for community-acquired pneumonia. *PLoS ONE* 2016; 11 (1): e0145929. doi: 10.1371/journal.pone.0145929. PubMed PMID: 26727202; PubMed Central PMCID: PMC4699794.
13. Pelton S.I., Shea K.M., Weycker D., Farkouh R.A., Strutton D.R., Edelsberg J. Rethinking risk for pneumococcal disease in adults: the role of risk stacking. *Open Forum Infect Dis* 2015; 2 (1): ofv020. doi: 10.1093/ofid/ofv020. PubMed PMID: 26034770; PubMed Central PMCID: PMC4438900.
14. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2015; 24. Доступно на URL: <https://www.rosminzdrav.ru/poleznye-resursy/klinicheskie-rekomendatsii-po-vaktsinoprofilaktike-pnevmokokkovoy-infektsii>. / Vaktsinoprofilaktika pnevmokokkovoj infekcii. Federal'nye klinicheskie rekomendacii. M.: 2015; 24. Dostupno na URL: <https://www.rosminzdrav.ru/poleznye-resursy/klinicheskie-rekomendatsii-po-vaktsinoprofilaktike-pnevmokokkovoy-infektsii>. [in Russian]
15. Aliberti S., Mantero M., Mirsaeidi M., Blasi F. The role of vaccination in preventing pneumococcal disease in adults. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: Suppl 5: 52–58. doi: 10.1111/1469-0691.12518. PubMed PMID: 24410778; PubMed Central PMCID: PMC4473770.
16. van der Poll T., Opal S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009; 374 (9700): 1543–56. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61114-4. PubMed PMID: 19880020.

17. Criner G.J., Bourbeau J., Diekemper R.L., Ouellette D.R., Goodridge D., Hernandez P. et al. Prevention of acute exacerbations of COPD: American College of Chest Physicians and Canadian Thoracic Society Guideline. *Chest* 2015; 147 (4): 894–942. doi: 10.1378/chest.14-1676. PubMed PMID: 25321320; PubMed Central PMCID: PMC4388124.
18. Dransfield M.T., Harnden S., Burton R.L., Albert R.K., Bailey W.C., Casaburi R. et al. Long-term comparative immunogenicity of protein conjugate and free polysaccharide pneumococcal vaccines in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 2012; 55 (5): e35–44. doi: 10.1093/cid/cis513. PubMed PMID: 22652582; PubMed Central PMCID: PMC3491850.
19. Dransfield M.T., Nahm M.H., Han M.K., Harnden S., Criner G.J., Martinez F.J. et al. Superior immune response to protein-conjugate versus free pneumococcal polysaccharide vaccine in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009; 180 (6): 499–505. doi: 10.1164/rccm.200903-0488OC. PubMed PMID: 19556517; PubMed Central PMCID: PMC2742743.
20. Мартынова А.В., Балабанова Л.А., Чулакова О.А. Мультилокусное секвенирование штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у пациентов пожилого возраста с внебольничными пневмониями. *Бюлл сибир мед* 2014; 13 (3): 40–405. / Martynova A.V., Balabanova L.A., Chulakova O.A. Mul'tilokusnoe sikenstipirovanie shtammov *Streptococcus pneumoniae*, vydelennyh u pacientov pozhilogo vozrasta s vnebol'nichnymi pnevmonijami. *Bjull sibir med* 2014; 13 (3): 40–405. [in Russian]
21. Лобзин Ю., Сидоренко С., Харит С., Беланов С., Волкова М., Гостев В. et al. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающие ведущие ологические формы пневмококковых инфекций. *Журн инфектол* 2013; 5 (4): 35–41. / Lobzin Ju., Sidorenko S., Harit S., Belanov S., Volkova M., Gostev V. et al. Serotipy *Streptococcus pneumoniae*, vyzyvajushhie vedushhie ologichneskie formy pevmokokkovykh infekcij. *Zhurn infektol* 2013; 5 (4): 35–41. [in Russian]
22. Фельдблюм И.В., Семериков В.В., Голоднова С.О., Николенько В.В., Захарова Ю.А., Воробьева Н.Н. Результаты серотипирования штаммов *S.pneumoniae*, циркулирующих на территории г. Перми. *Здоровье семьи* — 21 Век [Internet]. 2013 Апрель 06, 2016; 2(2):194–203 pp.]. Available from: <http://www.fh-21.perm.ru/download/2013-2-15.pdf>. / Fel'dbljum I.V., Semerikov V.V., Golodnova S.O., Nikolenko V.V., Zaharova Ju.A., Vorob'eva N.N. Rezul'taty serotipirovanija shtammov *S.pneumoniae*, cirkulirujushhih na territorii g. Permi. *Zdorov'e sem'i* — 21 Vek [Internet]. 2013 April' 06, 2016; 2(2):194–203 pp.]. Available from: <http://www.fh-21.perm.ru/download/2013-2-15.pdf>. [in Russian]
23. Николенько В.В., Фельдблюм И.В., Воробьева Н.Н. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, обуславливающие разе внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Практ мед* 2014; 7 (83): 40–42. / Nikolenko V.V., Fel'dbljum I.V., Vorobjova N.N. Serotipy *Streptococcus pneumoniae*, обусlovlivajushhie razе vnebol'nichnoj pnevmonii u VICH-inficirovannyh pacientov. *Prakt med* 2014; 7 (83): 40–42. [in Russian]
24. Огарков П.И., Жоголев С.Д. Материалы научной конференции 200-летия Военно-медицинской академии, СПб.: 1999: 223–227. / Ogarkov P.I., Zhogolev S.D. Materialy nauchnoj konferencii 200-letija Voenno-meditsinskoj akademii, SPb.: 1999: 223–227. [in Russian]
25. Калиногорская О.С., Беланов С.С., Волкова М.О., Гостев В.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность и серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010–2013 гг. *Антибиотики и химиотер* 2015; 60 (1-2): 10–8. / Kalinogorskaja O.S., Belanov S.S., Volkova M.O., Gostev V.V., Sidorenko S.V. Antibiotikorezistentnost' i serotipovyj sostav *Streptococcus pneumoniae*, vydelennyh u detej v Sankt-Peterburge v 2010-2013 gg. *Antibiotiki i himoter* 2015; 60 (1–2): 10–8. [in Russian]
26. Холодок Г.Н., Евсеева Г.П., Ивахнишина Н.М., Гарбуз Ю.А., Морозова Н.В., Козлов В.К. Актуальность вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции в г. Хабаровске. *Инфекц бол иммунол иммунотер* 2014; 3: 29–33. / Holodok G.N., Evseeva G.P., Ivahnishina N.M., Garbuz Ju.A., Morozova N.V., Kozlov V.K. Aktual'nost' vakcinoprofilaktiki pnevmokokkovoj infekcii v g. Habarovske. *Infekc bol immunol immunoter* 2014; 3: 29–33. [in Russian]
27. Mayanskiy N., Alyabieva N., Ponomarenko O., Lazareva A., Katosova L., Ivanenko A. et al. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *Int J Infect Dis* 2014; 20: 58–62. doi: 10.1016/j.ijid.2013.11.005. PubMed PMID: 24462930.
28. Song J.Y., Nahm M.H., Cheong H.J., Kim W.J. Impact of preceding flu-like illness on the serotype distribution of pneumococcal pneumonia. *PLoS ONE* 2014; 9 (4): e93477. doi: 10.1371/journal.pone.0093477. PubMed PMID: 24691515; PubMed Central PMCID: PMC3972234.
29. Ochoa-Gondar O., Gomez-Bertomeu F., Vila-Corcoles A., Raga X., Aguirre C., Utrera J. et al. [Prevalence of serotypes causing invasive pneumococcal disease in the region of Tarragona, Spain, 2006–2009: vaccine-serotype coverage for the distinct antipneumococcal vaccine formulations]. *Rev Esp Quimioter* 2015; 28 (1): 29–35. PubMed PMID: 25690142.
30. Vila-Corcoles A., Ochoa-Gondar O., Gomez-Bertomeu F., Raga-Luria X., Group E.S. Invasive pneumococcal disease in Catalanian elderly people, 2002–2009: serotype coverage for different anti-pneumococcal vaccine formulations at the beginning of the new conjugate vaccines era. *Vaccine* 2011; 29 (43): 7430–7434. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.066. PubMed PMID: 21803108.
31. Vila-Corcoles A., Ansa X., Ochoa-Gondar O., Satue E., de Diego C., Rodriguez-Blanco T. et al. Pneumococcal pneumonia in adults 60 years or older: incidence, mortality and prevention. *Med Clin* 2015. doi: 10.1016/j.medcli.2015.09.015. PubMed PMID: 26654560.
32. Tomczyk S., Lynfield R., Schaffner W., Reingold A., Miller L., Petit S. et al. Prevention of antibiotic-nonsusceptible invasive pneumococcal disease with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 2016; 62 (9): 1119–1125. doi: 10.1093/cid/ciw067. PubMed PMID: 26908787.
33. Kim L., McGee L., Tomczyk S., Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clin microbiol rev* 2016; 29 (3): 525–552. doi: 10.1128/CMR.00058-15. PubMed PMID: 27076637.
34. National Vaccine Advisory Committee. A Call for Greater Consideration for the Role of Vaccines in National Strategies to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria: Recommendations from the National Vaccine Advisory Committee: Approved by the National Vaccine Advisory Committee on June 10, 2015. *Public Health Rep* 2016; 131 (1): 11–16. PubMed PMID: 26843664; PubMed Central PMCID: PMC4716466.
35. Grabenstein J.D., Musey L.K. Differences in serious clinical outcomes of infection caused by specific pneumococcal serotypes among adults. *Vaccine* 2014; 32 (21): 2399–2405. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.096. PubMed PMID: 24637174.
36. Tatchenko V., Sidorenko S., Namazova-Baranova L., Mayanskiy N., Kulichenko T., Baranov A. et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program. *Expert Rev Vac* 2014; 13 (2): 257–264. doi: 10.1586/14760584.2013.871205. PubMed PMID: 24350587.
37. Ahl J., Littorin N., Forsgren A., Odenholt I., Resman F., Riesbeck K. High incidence of septic shock caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3—a retrospective epidemiological study. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 492. doi: 10.1186/1471-2334-13-492. PubMed PMID: 24148181; PubMed Central PMCID: PMC4015877.
38. Weinberger D.M., Harboe Z.B., Sanders E.A., Ndiritu M., Klugman K.P., Ruckinger S. et al. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2010; 51 (6): 692–699. doi: 10.1086/655828. PubMed PMID: 20715907; PubMed Central PMCID: PMC2927802.
39. Rodrigo C., Bewick T., Sheppard C., Greenwood S., McKeever T.M., Trotter C.L. et al. Impact of infant 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on serotypes in adult pneumonia. *Eur Respir J* 2015; 45 (6): 1632–1641. doi: 10.1183/09031936.00183614. PubMed PMID: 25792633.
40. Chalmers J.D., Campling J., Dicker A., Woodhead M., Madhava H. A systematic review of the burden of vaccine preventable pneumococcal disease in UK adults. *BMC Pulm Med* 2016; 16 (1): 77. doi: 10.1186/s12890-016-0242-0. PubMed PMID: 27169895; PubMed Central PMCID: PMC4864929.
41. Moore M.R., Link-Gelles R., Schaffner W., Lynfield R., Lexau C., Bennett N.M. et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *The Lancet Infect Dis* 2015; 15 (3): 301–309. doi: 10.1016/S1473-3099(14)71081-3. PubMed PMID: 25656600.
42. Slotved H.C., Dalby T., Hoffmann S. The effect of pneumococcal conjugate vaccines on the incidence of invasive pneumococcal disease caused by ten non-vaccine serotypes in Denmark. *Vaccine* 2016; 34 (6): 769–774. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.056. PubMed PMID: 26772630.
43. van der Linden M., Falkenhorst G., Perniciaro S., Imohl M. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany. *PLoS ONE* 2015; 10 (7): e0131494. doi: 10.1371/journal.pone.0131494. PubMed PMID: 26132078; PubMed Central PMCID: PMC4488910.
44. van der Linden M., Perniciaro S., Imohl M. Increase of serotypes 15A and 23B in IPD in Germany in the PCV13 vaccination era. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 207. doi: 10.1186/s12879-015-0941-9. PubMed PMID: 25940580; PubMed Central PMCID: PMC4424534.
45. Tin Tin Htar M., Christopoulou D., Schmitt H.J. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 419. doi: 10.1186/s12879-015-1147-x. PubMed PMID: 26468008; PubMed Central PMCID: PMC4606906.
46. Herrero F.S., Cardona C.G., Palop N.T., Fabrellas N.T., Briones M.L., Juan A.C. et al. The potential role of 13-valent pneumococcal conjugate

- vaccine in preventing respiratory complications in bacteraemic pneumococcal community-acquired pneumonia. *Vaccine* 2016; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.038>.
47. van Rossum A.M., Lysenko E.S., Weiser J.N. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect Immun* 2005; 73 (11): 7718–7726. doi: 10.1128/IAI.73.11.7718-7726.2005. PubMed PMID: 16239576; PubMed Central PMCID: PMC1273875.
48. Trzcinski K., Thompson C.M., Srivastava A., Basset A., Malley R., Lipsitch M. Protection against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* is mediated by antigen-specific CD4+ T cells. *Infect Immun* 2008; 76 (6): 2678–2684. doi: 10.1128/IAI.00141-08. PubMed PMID: 18391006; PubMed Central PMCID: PMC2423086.
49. Malley R., Trzcinski K., Srivastava A., Thompson C.M., Anderson P.W., Lipsitch M. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102 (13): 4848–53. doi: 10.1073/pnas.0501254102. PubMed PMID: 15781870; PubMed Central PMCID: PMC1555733.
50. Palacios G., Hornig M., Cisterna D., Savji N., Bussetti A.V., Kapoor V. et al. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS ONE* 2009; 4 (12): e8540. doi: 10.1371/journal.pone.0008540. PubMed PMID: 20046873; PubMed Central PMCID: PMC2795195.
51. van Werkhoven C.H., Huijts S.M., Bolkenbaas M., Grobbee D.E., Bonten M.J. The impact of age on the efficacy of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in elderly. *Clin Infect Dis* 2015. doi: 10.1093/cid/civ686. PubMed PMID: 26265498.
52. Huijts S., Bonten M. *Diagnosis and Prevention of Pneumococcal Community-Acquired Pneumonia*. 2015.
53. Bonten M.J., Huijts S.M., Bolkenbaas M., Webber C., Patterson S., Gault S. et al. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *The New England J Med* 2015; 372 (12): 1114–1125. doi: 10.1056/NEJMoa1408544. PubMed PMID: 25785969.
54. Ewald H., Briel M., Vuichard D., Kreutle V., Zhydkov A., Gloy V. The clinical effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113 (9): 139–146. doi: 10.3238/arztebl.2016.0139. PubMed PMID: 26987462; PubMed Central PMCID: PMC4802351.
55. Moberley S., Holden J., Tatham D.P., Andrews R.M. Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2013;1:CD000422. doi: 10.1002/14651858.CD000422.pub3. PubMed PMID: 23440780.
56. Cadeddu C., De Waure C., Gualano M.R., Di Nardo F., Ricciardi W. 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) for the prevention of invasive pneumococcal diseases (IPDs) in the elderly: is it really effective? *J Prev Med Hyg* 2012; 53 (2): 101–103. PubMed PMID: 23240169.
57. Huss A., Scott P., Stuck A.E., Trotter C., Egger M. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *CMAJ* 2009; 180 (1): 48–58. doi: 10.1503/cmaj.080734. PubMed PMID: 19124790; PubMed Central PMCID: PMC2612051.
58. Kraicer-Melamed H., O'Donnell S., Quach C. The effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine 23 (PPV23) in the general population of 50 years of age and older: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 2016; 34 (13): 1540–1550. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.024. PubMed PMID: 26899372.
59. Ochoa-Gondar O., Vila-Corcoles A., Rodriguez-Blanco T., Gomez-Bertomeu F., Figuerola-Massana E., Raga-Luria X. et al. Effectiveness of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against community-acquired pneumonia in the general population aged ≥ 60 years: 3 years of follow-up in the CAPAMIS study. *Clin Infect Dis* 2014; 58(7): 909–917. doi: 10.1093/cid/ciu002. PubMed PMID: 24532544.
60. Elston J.W., Santaniello-Newton A., Meigh J.A., Harmer D., Allgar V., Allison T. et al. Increasing incidence of invasive pneumococcal disease and pneumonia despite improved vaccination uptake: surveillance in Hull and East Yorkshire, UK, 2002–2009. *Epidemiology and Infection*. 2012; 140 (7): 1252–1266. doi: 10.1017/S0950268811001907. PubMed PMID: 22040368.
61. Johnstone J., Marrie T.J., Eurich D.T., Majumdar S.R. Effect of pneumococcal vaccination in hospitalized adults with community-acquired pneumonia. *Arch Internal Med* 2007; 167 (18): 1938–1943. doi: 10.1001/archinte.167.18.1938. PubMed PMID: 17923592.
62. Andrews N.J., Waight P.A., George R.C., Slack M.P., Miller E. Impact and effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in the elderly in England and Wales. *Vaccine* 2012; 30 (48): 6802–6808. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.019. PubMed PMID: 23000122.
63. van Werkhoven C.H., Huijts S.M., Paling F.P., Bonten M.J. The scrutiny of identifying community-acquired pneumonia episodes quantified bias in absolute effect estimation in a population-based pneumococcal vaccination trial. *J Clin Epidemiol* 2016; 69: 185–192. doi: 10.1016/j.jclinepi.2015.07.004. PubMed PMID: 26197241.
64. Schiffner-Rohe J., Witt A., Hemmerling J., von Eiff C., Leverkus F.W. Efficacy of PPV23 in preventing pneumococcal pneumonia in adults at increased risk — a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2016; 11 (1): e0146338. doi: 10.1371/journal.pone.0146338. PubMed PMID: 26761816.
65. Maruyama T., Taguchi O., Niederman M.S., Morser J., Kobayashi H., Kobayashi T. et al. Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents: double blind, randomised and placebo controlled trial. *BMJ (Clin Res Ed)*. 2010; 340: 1004. doi: 10.1136/bmj.c1004. PubMed PMID: 20211953; PubMed Central PMCID: PMC2834887.
66. Castiglia P. Recommendations for pneumococcal immunization outside routine childhood immunization programs in Western Europe. *Adv Ther* 2014; 31 (10): 1011–44. doi: 10.1007/s12325-014-0157-1. PubMed PMID: 25300593; PubMed Central PMCID: PMC4209094.
67. Diao W.Q., Shen N., Yu P.X., Liu B.B., He B. Efficacy of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in preventing community-acquired pneumonia among immunocompetent adults: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Vaccine* 2016; 34 (13): 1496–1503. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.023. PubMed PMID: 26899376.
68. Wiemken T.L., Carrico R.M., Klein S.L., Jonsson C.B., Peyrani P., Kelley R.R. et al. The effectiveness of the polysaccharide pneumococcal vaccine for the prevention of hospitalizations due to *Streptococcus pneumoniae* community-acquired pneumonia in the elderly differs between the sexes: results from the Community-Acquired Pneumonia Organization (CAPO) international cohort study. *Vaccine* 2014; 32 (19): 2198–2203. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.048. PubMed PMID: 24613522.
69. Klein S.L., Poland G.A. Personalized vaccinology: one size and dose might not fit both sexes. *Vaccine* 2013; 31 (23): 2599–2600. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.070. PubMed PMID: 23579257.
70. Shea K.M., Edelsberg J., Weycker D., Farkouh R.A., Strutton D.R., Pelton S.I. Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions. *Open Forum Infect Dis* 2014; 1 (1): ofu024. doi: 10.1093/ofid/ofu024. PubMed PMID: 25734097; PubMed Central PMCID: PMC4324183.
71. Kim D.K., Bridges C.B., Harriman K.H. Advisory committee on immunization p. advisory committee on immunization practices recommended immunization schedule for adults aged 19 years or older: United States, 2016. *Ann Intern Med* 2016; 164 (3): 184–194. doi: 10.7326/M15-3005. PubMed PMID: 26829913.
72. Pilishvili T., Bennett N.M. Pneumococcal disease prevention among adults: strategies for the use of pneumococcal vaccines. *American J Prevent Med* 2015; 49: 6: Suppl 4: S383–390. doi: 10.1016/j.amepre.2015.09.008. PubMed PMID: 26590438.
73. Joint Committee on Vaccination and Immunisation. Interim JCVI statement on adult pneumococcal vaccination in the UK. 2015. Available at URL: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/477966/JCVI_pneumococcal.pdf.
74. Choi W.S., Choi J.H., Kwon K.T., Seo K., Kim M.A., Lee S.O. et al. Revised adult immunization guideline recommended by the Korean society of infectious diseases, 2014. *Infect Chemother* 2015; 47 (1): 68–79. doi: 10.3947/ic.2015.47.1.68. PubMed PMID: 25844267; PubMed Central PMCID: PMC4384453.
75. Conseil Supérieur de la Santé. Recommandations pour la vaccination des enfants présentant un risque accru de maladie invasive à pneumocoques. 2014. http://www.health.belgium.be/filestore/19100960_FR/CSS_9210_pneumoadultes_light.pdf. Assessed Apr 04, 2016.
76. Statens Serum Institute. Suggestions for pneumococcal vaccination outside the childhood vaccination programme. [http://www.ssi.dk/English/News/EPI-NEWS/2014/No 40 - 2014.aspx](http://www.ssi.dk/English/News/EPI-NEWS/2014/No%2040-2014.aspx). Assessed Apr 04, 2016.
77. Conseil supérieur des maladies infectieuses. Vaccination contre le pneumocoque pour les populations à risque ou âgées de 65 Ans et plus, 2014. <http://www.sante.public.lu/fr/espace-professionnel/recommandations/conseil-maladies-infectieuses/infection-pneumocoques/2015-personne-risque.pdf>. Assessed Apr 04, 2016.
78. Froes F., Diniz A., Robalo Cordeiro C., Serrado M., Ramalho de Almeida A., Portuguese Respiratory S. Consensus document for the prevention of respiratory infections in adults. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2014; 20 (2): 111–114. doi: 10.1016/j.rppneu.2014.02.001. PubMed PMID: 24613252.
79. Impfpfehlungen für das Gesundheitspersonal in Österreich, 2012. http://bmg.gv.at/home/Schwerpunkte/Gesundheitsfoerderung_Praevention/Impfen/Impfpfehlungen_fuer_das_Gesundheitspersonal_in_Oessterreich. Assessed Apr 04, 2016.
80. Kobayashi M., Bennett N.M., Gierke R., Almendares O., Moore M.R., Whitney C.G. et al. Intervals between PCV13 and PPSV23 vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Mmwr*. 2015; 64 (34): 944–947. doi: 10.15585/mmwr.mm6434a4. PubMed PMID: 26334788.

81. *Esposito S., Bonanni P., Maggi S., Tan L., Ansaldi F., Lopalco P.L. et al.* Recommended immunization schedules for adults: clinical practice guidelines by the Escmid Vaccine Study Group (EVASG), European Geriatric Medicine Society (EUGMS) and the World Association for Infectious

Diseases and Immunological Disorders (WAidid). *Hum Vaccin Immunother.* 2016: 1—18. doi: 10.1080/21645515.2016.1150396. PubMed PMID: 27135390.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гучев Игорь Анатольевич — к.м.н. подполковник медицинской службы в запасе. г. Смоленск orcid.org/0000-0002-8958-5767

**ТЕНДЕНЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ
КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ
ЗА 16-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД.**

**TRENDS AND MOLECULAR MECHANISMS
OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN CLINICAL
STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM COMPANION
ANIMALS OVER A 16 YEAR PERIOD / N. COUTO,
C. MONCHIQUE, A. BELAS, C. MARQUES, L. T. GAMA,
C. POMBA*// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
CHEMOTHERAPY 2016; 71: 6: 1479—1487.**

Исследовали эволюцию устойчивости к антимикробным препаратам, соответствующие механизмы и молекулярные характеристики *Staphylococcus* spp., с 1999 г. по 2014 г. Была определена чувствительность к 38 антимикробным препаратам у 632 клинических штаммов стафилококков, выделенных от домашних животных (собаки, кошки, лошади и др.). С помощью ПЦР выявлены 20 генов антимикробной устойчивости, включая *mecA* и *mecC*. Метициллинорезистентные (MR) стафилококки были охарактеризованы методами *spa* (*Staphylococcus aureus*), SCC*mec*, MLST и PFGE типированием. Статистический анализ был выполнен по SAS v. 9.3, различия считали релевантными (значимыми) при $p \leq 0,05$. Ген *mecA* был идентифицирован у 74 штаммов стафилококков (11,6%): 11 MRSA (40,7%), 40 MR *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP; 8,7%) и 23 MR коагулазонегативных стафилококков (CoNS, 26,7%). Со временем устойчивость к большинству антимикробных препаратов и число *mecA*-положительных штаммов значительно увеличились. Было установлено 18 *spa* типов, в т.ч. 2 новых. MRSA штаммы были разделены на 3 PFGE группы, включающие ST22-IV, ST105-II, ST398-V и ST5-VI. Большинство MR *Staphylococcus epidermidis* относились к клональному комплексу 5 (CC5), включая новые ST, и составляли 8 PFGE кластеров. MRSP были сгруппированы в 5 PFGE типов и включали ST45-NT, ST71-II-III, ST195-III, ST196-V, ST339-NT, ST342-IV и новый ST400-III. У MR *Staphylococcus haemolyticus* было установлено 2 PFGE кластера. Значительный рост устойчивости к антимикробным препаратам и числа *mecA*-положительных штаммов в последнее время вызывает озабоченность. Более того, некоторые штаммы обладают множественной устойчивостью (MDR), которая усложняет лечение антибиотиками и увеличивает риск их переноса человеку или штаммам, выделенным от него. Были обнаружены некоторые клональные связи у MRSA и MR *S. epidermidis*, циркулирующих в больницах и среди населения, что даёт основание предполагать, что домашние животные могут

быть инфицированы ими и содействовать диссеминации опасных для человека клонов. Необходимы неотложные меры по установлению клинических пограничных значений чувствительности и руководства по назначению антимикробных средств.

* Antimicrobial and Biocide Resistance Laboratory, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-UL), Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal.

**ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ
НА ЭВОЛЮЦИЮ *ENTEROCOCCUS FAECIUM*.**

**IMPACT OF ANTIBIOTIC USE ON THE EVOLUTION
OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* /J. I. WURSTER,
J. T. SAAVEDRA, M. S. GILMORE*// THE JOURNAL
OF INFECTIOUS DISEASES 2016; 213: 12: 1862—1865.**

Энтерококки — обычные обитатели желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных, от беспозвоночных до человека и ранее эволюционировали в первичном микробном сообществе ЖКТ. Это предположение подтверждается их вездесущностью и направлением развития их генома как показателем адаптации к хозяину в зависимости от его потребностей питания, диеты или от питательных потребностей других членов консорциума ЖКТ. В результате широкого применения антибиотиков за последние 75 лет *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* эволюционировали в разных направлениях, некоторые из которых привели к возникновению MDR-возбудителей инфекций, ставших эндемиками во многих больницах. Конкуренция среди микробов кишечника очень велика. В связи с этим необходимо принимать во внимание концепцию «цена фитнеса» при обсуждении микробов, приобретших антибиотикорезистентность. Энтерококки не только приобретают устойчивость к антибиотикам, но используют и другие пути адаптации к уникальным условиям больничной экологической ниши. Встаёт вопрос, являются ли штаммы с множественной устойчивостью результатом более чем 80-летней истории адаптации к необычным условиям роста в кишечнике больного, леченного антибиотиками (с последующими циклами пребывания в условиях больницы, выживания при дезинфекции, чистки, высушивания, реколонизации новых больных) и как эффективно они конкурируют в нормальном кишечнике человека. Ответ на этот вопрос сможет объяснить, почему ванкомициноустойчивые штаммы *Enterococcus* (VRE) и вызываемые ими инфекции стали обычным явлением в больни-

це, но редкими среди населения. (См. статью Montealegre et al в этом же выпуске журнала).

* Department of Ophthalmology and Department of Microbiology and Immunobiology, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School, 243 Charles St, Gilmore Lab, Connector Bldg Rm CB703, Boston, MA 02114.

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ДОЗ АМОКСИЦИЛЛИНА НА БИОПЛЁНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USA300.

EFFECTS OF LOW-DOSE AMOXICILLIN ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USA300 BIOFILMS / K. D. MLYNEK, M. T. CALLAHAN, A. V. SHIMKEVITCH, J. T. FARMER, J. L. ENDRES, M. MARCHAND, K. W. BAYLES, A. R. HORSWILL, J. B. KAPLAN* // ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHERAPY 2016; 60; 5: 2639—2651

Ранее было показано, что суб-МПК бета-лактамов антибиотиков стимулируют образование биоплёнок большинством метициллиноустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA). Определяли влияние суб-МПК амоксициллина (AMX) на образование биоплёнки эпидемическим внебольничным штаммом MRSA USA300. Было установлено, что суб-МПК AMX повышает способность клеток USA300 прикрепляться к поверхностям и образовывать биоплёнки в статических и проточных условиях. Биоплёнки, образованные в присутствии суб-МПК AMX, были толще, содержали больше пилей и тоннельных структур, были менее пористыми, чем плёнки, образованные в отсутствие антибиотика. Образование биоплёнки в присутствии суб-МПК AMX коррелировало с образованием внеклеточной ДНК (е-ДНК). Однако, количества е-ДНК, выделяемой только при лизисе, индуцированном AMX, было недостаточно для стимуляции биоплёнки. Суб-МПК двух других антибиотиков, действующих на клеточную стенку, но имеющих другие механизмы действия — d-циclosерин и фосфомицин — также стимулировали е-ДНК-зависимое образование биоплёнки, возможно, вследствие адаптации клетки на стресс клеточной стенки. Поиск в библиотеке USA300 транспозонов мутантов, дефицитных по образованию биоплёнки в присутствии суб-МПК AMX, выявил известные медиаторы устойчивости к бета-лактамам и образованию биоплёнки у *S. aureus*, а также новые гены, ранее не ассоциированные с данными фенотипами. Полученные результаты связывают явления стресса клеточной стенки и образования биоплёнки MRSA. Зависимое от е-ДНК образование биоплёнки штаммом USA300 при низких дозах AMX, может быть использовано для

идентификации новых генов, играющих роль в устойчивости MRSA к бета-лактамам и образовании биоплёнки.

*Department of Biology, American University, Washington, DC, USA.

ИНАКТИВАЦИЯ ИЛИ ПОДАВЛЕНИЕ AcrAB-TolC ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE, ОБРАЗУЮЩИХ КАРБАПЕНЕМАЗУ, К КАРБАПЕНЕМАМ.

INACTIVATION OR INHIBITION OF AcrAB-TolC INCREASES RESISTANCE OF CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE TO CARBAPENEMS / H. T. H. SAW, M. A. WEBBER, S. MUSHTAQ, N. WOODFORD, L. J. V. PIDDOCK* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 6: 1510—1519.

Предметом исследования было определение роли системы мультитекарственного помпового выброса AcrAB-TolC на устойчивость к карбапенемам у образующих карбапенемазу штаммов Enterobacteriaceae и влияние ингибитора помпового выброса PABN на указанную устойчивость. BSAC методом разведения в агаре была определена чувствительность к 6 бета-лактамовым антибиотикам у штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium и их соответствующих AcrAB-TolC мутантов, каждый из которых содержал несущие карбапенемазу плазмиды (pKpQIL-UK с *bla*_{KPC} и pNDM-HK с *bla*_{NDM}). Также была определена чувствительность к эртапенему в присутствии 25 и 100 мг/л PABN у 86 недублирующихся клинических штаммов-продуцентов карбапенемазы: OXA-48-подобные ($n=18$), IMP ($n=12$), VIM ($n=16$), NDM ($n=20$) и KPC ($n=20$). С помощью SDS-PAGE был определён белковый профиль наружной мембраны. У продуцирующих карбапенемазу AcrAB мутантов *K. pneumoniae* и *E. coli*, а также TolC мутанта *Salmonella Typhimurium* устойчивость к карбапенемам увеличилась. У *Salmonella Typhimurium* повышение значения МПК карбапенема коррелировало с утратой OmpF. Шестьдесят два ($n=62$; 72%) клинических штамма были более устойчивы к эртапенему в присутствии PABN. Методом SDS-PAGE было показано влияние присутствия PABN на образование порина наружной мембраны, ассоциирующееся с повышенным значением МПК эртапенема. Таким образом, пониженная чувствительность к карбапенемам у продуцирующих карбапенемазу Enterobacteriaceae в отсутствие AcrAB и TolC и/или при наличии ингибитора помпового выброса (например, PABN) вызвана изменениями экспрессии порина (OmpF). Инги-

биторы помпового выброса не усиливают активность карбапенемов, но скорее могут повышать уровень устойчивости у продуцентов карбапенемазы.

* Antimicrobials Research Group, Institute of Microbiology & Infection, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK.

АКТИВНОСТЬ ЦЕФТАЗИДИМ-АВИБАКТАМА В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ АМРС И РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ, СОБРАННЫХ В РАМКАХ ГЛОБАЛЬНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ INFORM В ПЕРИОД 2012—2014 ГГ.

ACTIVITY OF CEFTAZIDIME-AVIBACTAM AGAINST EXTENDED-SPECTRUM- AND AMPC β -LACTAMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE COLLECTED IN THE INFORM GLOBAL SURVEILLANCE STUDY FROM 2012 TO 2014 / J. A. KARLOWSKY, D. J. BIEDENBACH, K. M. KAZMIERCZAK*, G. G. STONE, D. F. SAHM // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2016; 60: 5: 2849—2857.

Была оценена *in vitro* активность цефтазидим-авибактама в отношении 34062 штаммов Enterobacteriaceae, выделенных от больных с инфекциями внутрибрюшинными, мочевого тракта, кожи и мягких тканей, нижних дыхательных путей и кровотока, собранных в рамках глобального INFORM (International Network For Optimal Resistance Monitoring) обследования (176 лабораторий медицинских центров 39 стран) с 2012 г. по 2014 г. В целом, 99,5% штаммов Enterobacteriaceae были чувствительны к цефтазидим-авибактаму, согласно пограничным значениям FDA (чувствительные, МПК $\leq$ 8 мкг/мл; устойчивые, МПК $\geq$ 16 мкг/мл). У отдельных видов Enterobacteriaceae, значения МПК₉₀ были от 0,06 мкг/мл для *Proteus* spp. до 1 мкг/мл для *Enterobacter* spp. и *Klebsiella pneumoniae*. Чувствительные к карбапенему штаммы *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, и *Proteus mirabilis*, относящиеся к фенотипу с бета-лактамазой расширенного спектра (БЛРС) или с МПК $\geq$ 16 мкг/мл при неподтверждённом с помощью подавления клавулановой кислотой БЛРС фенотипе, далее были охарактеризованы с помощью методики микропипирования с дополнительным применением ПЦР для обнаружения генов специфической или плазмидной AmpC бета-лактамазы. Цефтазидим-авибактам был высоко активен в отношении штаммов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, и *P. mirabilis*, продуцирующих (подтверждено на молекулярном уровне) БЛРС ($n=5354$; МПК₉₀, 0,5 мкг/мл; 99,9% чувствительность), плазмидную AmpC ($n=246$; МПК₉₀, 0,5 мкг/мл; 100% чувствительность) и БЛРС и AmpC бета-лактамазы одновременно

($n=152$; МПК₉₀, 1 мкг/мл; 100% чувствительность). Итак, цефтазидим-авибактам продемонстрировал высокую активность в отношении клинических штаммов Enterobacteriaceae из глобальной коллекции, включая продуценты БЛРС и AmpC бета-лактамазы.

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

ПОЯВЛЕНИЕ ПАН-РЕЗИСТЕНТНОЙ ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ КАРБАПЕНЕМАЗЫ KLEBSIELLA PNEUMONIAE НА КРИТЕ, ГРЕЦИЯ (ОЖИДАЕМАЯ ПРОБЛЕМА).

EMERGENCE OF PAN-RESISTANCE IN KPC-2 CARBAPENEMASE-PRODUCING KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN CRETE, GREECE: A CLOSE CALL / E. BATHOORN, C. TSIOUTIS, J. M. DA SILVA VOORHAM, E. V. SCOULICA, E. IOANNIDOU, K. ZHOU, J. W. ROSSEN, A. GIKAS, A. W. FRIEDRICH*, H. GRUNDMANN // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 5: 1207—1212.

КРС-2- продуцирующая *Klebsiella pneumoniae* (КРС-КР) ST258 быстро распространяется и часто ассоциируется с тяжёлыми внутрибольничными инфекциями. Антибиотиками выбора в таких случаях остаются только колистин и тигециклин. Описан генетический базис КРС-КР штаммов, выделенных на Крите, Греция. Была протестирована чувствительность 34 клинических штаммов, выделенных от госпитализированных больных в 2010 г. и 2013—14 гг. Секвенированием целого генома этих штаммов были проанализированы гены приобретённой устойчивости и мутированные гены. Все КРС-КР штаммы принадлежали к ST258 за исключением одного ST147 штамма. Среди штаммов 2014 г. 26% были нечувствительны ко всем антибиотикам по сравнению с 0% 11 штаммов, выделенных в 2010 г. Устойчивость к колистину была связана с мутациями в *mgrB*, присутствующими у 61% штаммов 2014 г. MLST-анализ ядра генома показал, что пан-резистентные штаммы близко родственны и находятся в двух отдельных кластерах. Установлено, что на Крите КРС-КР штаммы быстро эволюционируют в направлении пан-резистентности. Были идентифицированы маркёры пан-резистентности и показано, что MLST ядра генома является перспективным инструментом для молекулярного выявления (фингер-принтинга) КРС-КР ST258.

*Department of Medical Microbiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands.

**ФАГОЦИТОЗ И ГИБЕЛЬ УСТОЙЧИВОЙ
К КАРБАПЕНЕМАМ ST258 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА.**

**PHAGOCYTOSIS AND KILLING OF CARBAPENEM-
RESISTANT ST258 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
BY HUMAN NEUTROPHILS / S. D. KOBAYASHI,
A. R. PORTER, D. W. DORWARD, A. J. BRINKWORTH,
L. CHEN, B. N. KREISWIRTH, F. DELEO* // THE JOURNAL
OF INFECTIOUS DISEASES 2016; 213: 10: 1615—1622.**

Устойчивые к карбапенемам штаммы *Klebsiella pneumoniae* классифицируются мультилокусным сиквенс-типированием (MLST) как ST258 и относятся к широко распространённым мультилекарственно устойчивым (MDR) внутрибольничным патогенам. Лечение инфекций, вызванных такими микроорганизмами, затруднено, смертность при этом высокая. Причина подобной «успешности» ST258, помимо устойчивости к антибиотикам, до конца не определена. Была проверена гипотеза о том, что ST258 *K.pneumoniae* обладает повышенной способностью избегать гибели от воздействия нейтрофилами человека, первой линии клеточной защиты от бактериальных инфекций. Связывание и поглощение ST258 нейтрофилами человека было ограниченным, соответственно, была ограничена и гибель бактерий. С другой стороны, трансмиссионная электронная микроскопия показала быстрое поглощение и деградацию внутри нейтрофильных фагосом любого захваченного организма, что свидетельствовало о том, что выживание при обработке нейтрофилами в большей степени зависит от ограниченности фагоцитоза, чем от микробиоцидной устойчивости после поглощения. Авторы полагают, что мощным терапевтическим приёмом при лечении инфекций, обусловленных устойчивой к карбапенемам ST258 *K.pneumoniae*, явилось бы усиление фагоцитоза нейтрофилами.

* Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 903 S 4th St, Hamilton, MT 59840.

**IN VITRO И IN VIVO АКТИВНОСТЬ OP0595, НОВОГО
ДИАЗАБИЦИКЛООКТАНА, В ОТНОШЕНИИ
CTX-M-15- ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ *ESCHERICHIA COLI*
И КРС-ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.**

**IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITIES OF OP0595, A NEW
DIAZABICYCLOOCTANE, AGAINST CTX-M-15-POSITIVE
ESCHERICHIA COLI AND KPC-POSITIVE *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* / A. MORINAK*, Y. TSUTSUMI,
K. YAMADA, Y. TAKAYAMA, S. SAKAKIBARA,
T. TAKATA, T. ABE, T. FURUUCHI, S. INAMURA,**

**Y. SAKAMAKI, N. TSUJII, T. IDA // ANTIMICROBIAL
AGENTS CHEMOTHERAPY 2016; 60: 5: 3001—3006.**

Одним из направлений эволюции грамотрицательных бактерий является образование бета-лактамаз различного спектра действия, что создаёт проблемы антимикробной химиотерапии. Новый диазабициклооктан OP0595, ингибитор сериновых бета-лактамаз, действует как антибиотик, и как независимый от наличия бета-лактамазы «усилитель» действия беталактамов в отношении Enterobacteriaceae. Была определена оптимальная концентрация OP0595 одного и в комбинации с пиперациллином, цефепимом и меропенемом в *in vitro* «time-kill» исследованиях и на модельных *in vivo* инфекциях, вызванных 5 штаммами CTX-M-15-положительной *Escherichia coli* и 5 штаммами КРС-положительной *Klebsiella pneumoniae*. Было установлено, что концентрация OP0595, равная 4 мкг/мл достаточна для эффективного действия всех комбинаций со всеми 3-мя беталактамами. Как в исследованиях *in vitro* «time-kill», так и на *in vivo* модельных инфекциях комбинация цефепим-OP0595 была более эффективна, чем один цефепим, в отношении всех протестированных бета-лактамазо-положительных штаммов, тогда как один OP0595 был слабее или совсем не эффективен. Полученные данные означают, что использование OP0595 в комбинациях с беталактамами позволяет выявить все антимикробные функции OP0595.

* Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Yokohama, Japan.

**НОВЫЕ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПЕПТИДЫ
ФАГОВОГО ЛИЗИНА КАК ЭФФЕКТИВНОЕ
АНТИМИКРОБНОЕ СРЕДСТВО ПРОТИВ
ACINETOBACTER BAUMANNII С МНОЖЕСТВЕННОЙ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.**

**NOVEL ENGINEERED PEPTIDES OF A PHAGE LYSIN
AS EFFECTIVE ANTIMICROBIALS AGAINST
MULTIDRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER
BAUMANNII* / M. THANDAR, R. LOOD, B. Y. WINER,
D. R. DEUTSCH, C. W. EULER, V. A. FISCHETTI* //
ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2016;
60: 5: 2671—2679.**

Acinetobacter baumannii — грамотрицательная патогенная бактерия, ответственная за ряд внутрибольничных инфекций. Рост и распространение клонов *A.baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью в последнее время стали стимулом поиска альтернативных методов лечения, в т.ч. бактериофаговых эндолизинов с высокой антибактериальной активностью. Общей чертой таких лизингов является присутствие С-терми-

нального домена с положительным зарядом высокого потенциала, предположительно, повышающего проницаемость наружной мембраны. Было показано, что аминокислоты 108 и 138 С-терминального домена фагового лизина PlyF307, названного P307, самодостаточны для бактерицидного действия в отношении *A. baumannii* (>3 logs). Более того, P307 может быть модифицирован для улучшения активности, наиболее активное производное — P307_{SQ-8C} (>5-log kill). Оба соединения, P307 и P307_{SQ-8C}, проявили высокую *in vitro* активность в отношении клеток *A. baumannii*, заключённых в биоплёнке. Сверх того, значения МПК P307_{SQ-8C} были сравнимы со значениями МПК левофлоксацина и цефтазидима, и он действовал синергидно с полимиксином В. Как было показано, пептиды действуют бактерицидно, разрушая бактериальную цитоплазматическую мембрану, но не лизируют красные кровяные тельца и клетки В человека. Однако сыворотка подавляет их литическую активность. На модели кожной инфекции мышей, вызываемой *A. baumannii*, P307_{SQ-8C} за 2 ч снижал бактериальную нагрузку на 2 logs. Настоящее исследование продемонстрировало перспективность использования пептидных производных бактериофаговых лизинов для обработки местных инфекций и удаления биоплёнок, образованных грамотрицательными патогенами.

* Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Immunology, The Rockefeller University, New York, New York, USA.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АРТИЛИЗИНА ART-175 В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ И ПЕРСИСТИРУЮЩИХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII*.

EFFICACY OF ARTILYSIN ART-175 AGAINST RESISTANT AND PERSISTENT *ACINETOBACTER BAUMANNII* / V. DEFRAINE, J. SCHUERMANS, B. GRYMONTREZ, S. K. GOVERS, A. AERTSEN, M. FAUVART, J. MICHIELS, R. LAVIGNE, Y. BRIERS* // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* JUNE 2016; 60: 6: 3480—3488.

Эндолизины, образуемые бактериофагом, представляют новый класс антибактериальных средств с уникальным механизмом действия, а именно, разрушение пептидогликана. Грамотрицательные бактерии нечувствительны к эндолизинам из-за защитного действия наружной мембраны. Артилизины преодолевают этот барьер. Их действие может быть оптимизировано благодаря соединению с отдельными эндолизинами с помощью специфических пептидов, дестабилизирующих наружную мембрану. Артилизин Art-175 представляет модифицированный вариант эндо-

лизина KZ144, присоединённый к N-терминальному концу SMAP-29. Ранее была показана высокая чувствительность *Pseudomonas aeruginosa* к Art-175. В настоящем исследовании сообщается о сильном бактерицидном действии Art-175 на клетки MDR *Acinetobacter baumannii*, находящиеся в стационарной фазе, вплоть до полной элиминации инокулята высокой плотности ($\geq 10^8$ CFU/ml). Помимо активно делящихся клеток, Art-175 также убивает персистирующие клетки. Мгновенную гибель клеток *A. baumannii* при контакте с Art-175 можно наблюдать после иммобилизации бактерий в проточной микрочайке. Гибель клеток происходит из-за осмотического лизиса после разрушения пептидогликана. Скорость гибели клеток увеличивается при добавлении 0,5 мМ ЭДТА. Устойчивость к Art-175 не развивается ни под действием селективного прессинга, ни в результате развития перекрёстной устойчивости при существующих механизмах устойчивости. Таким образом, Art-175 высоко активен в отношении как *A. baumannii*, так и *P. aeruginosa*, двух наиболее опасных патогенов из порядка Pseudomonadales.

* Laboratory of Gene Technology, Department of Biosystems, KU Leuven, Heverlee, Belgium

* Laboratory of Applied Biotechnology, Department of Applied Biosciences, Ghent University, Ghent, Belgium.

СТРАТЕГИЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ УСТОЙЧИВЫМ К ПОЛИМИКСИНУ В *ACINETOBACTER BAUMANNII*.

STRATEGIES FOR THE TREATMENT OF POLYMYXIN B-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* INFECTIONS/ T. CEVALLOS MENEGUCCI, J. ALBIERO, L. BUSATO MIGLIORINI, J. LEAL BORGES ALVES, G. FUKITA VIANA, J. MAZUCHELLI, F. ELAINE CARRARA-MARRONI, C. LUIZ CARDOSO, M. CRISTINA BRONHARO TOGNIM*// *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS* 2016; 47: 5: 380—385.

Проанализирована активность меропенема (MEM), фосфомицина (FOF) и полимиксина В (PMB), по отдельности и в комбинациях, а также оценена оптимизация фармакодинамического индекса MEM и FOF в отношении 6 клонально не родственных штаммов *Acinetobacter baumannii*, образующих ОХА-23 (включая 3 штамма, устойчивые к PMB). Комбинации антибиотиков оценивали методом «шахматной доски», при значении индекса фракционной ингибиторной концентрации $\leq 0,5$ их взаимодействие рассматривали как синергидное. Фармакодинамический

анализ схем дозирования MEM и FOF выполнен по модели Монте Карло. При значениях фармакодинамического индекса ($\%fT > \text{МПК}$) MEM и FOF, равных $\geq 40\%$ и $\geq 70\%$, соответственно, возможность достижения цели (РТА) $\geq 0,9$ рассматривалось как адекватная. Наивысшую синергидную активность в отношении РМВ-устойчивых штаммов показали комбинации РМВ+MEM и РМВ+FOF+MEM ($\text{FICI} \leq 0,125$). Штаммы, согласно критериям CLSI ранее относящиеся к РМВ-устойчивым, были переведены в категорию чувствительных. Фармакодинамическая оценка показала, что при МПК FOF, равной ≤ 16 мкг/мл введение лекарства болюсным дозированием, и пролонгированной инфузией позволяет достичь адекватного значения РТА, тогда как при МПК, равной 32 мкг/мл — только при инфузии достигается адекватное значение РТА. При значении МПК MEM 4 мкг/мл адекватное значение РТА $\geq 0,9$ может быть получено при болюсной схеме лечения по 1,5 г каждые 6 ч (1,5 г / 6 ч) и инфузии по схемам: 1,0 г / каждые 8 ч; 1,5 г / 6 ч и 2,0 г / 8 ч. Результаты антимикробного и фармакодинамического анализов могут помочь в лечении инфекций, вызванных MDR *A.baumannii*. Однако клинические исследования *in vivo*, в т.ч. в/в антимикробная FOF терапия важны для оценки истинной роли этих соединений.

* Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДИНАМИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОЛИСТИНА И МЕРОПЕНЕМА НА ФК/ФД МОДЕЛИ С ДИКИМ И УСТОЙЧИВЫМ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

DYNAMIC INTERACTION OF COLISTIN AND MEROPENEM ON A WT AND A RESISTANT STRAIN OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AS QUANTIFIED IN A PK/PD MODEL / A. F. MOHAMED, A. N. KRISTOFFERSSON*, M. KARVANEN, E. I. NIELSEN, O. CARLS, L. E. FRIBERG // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 5: 1279—1290.

Комбинированная терапия может быть стратегическим приёмом, обеспечивающим эффективную бактерицидность при лечении инфекций, вызванных грамотрицательной бактерией *Pseudomonas aeruginosa*, склонной к развитию устойчивости. Задачей исследования было разработать ФК/ФД модель, описывающую *in vitro* кривую бактерицидного действия колистина (KOL) и меропенема (MEM) как по отдельности, так и в

комбинации на штаммы *P.aeruginosa*: дикого типа (WT) и устойчивого к MEM. *In vitro* «time—kill» исследования были выполнены с *P.aeruginosa* WT (ATCC 27853) (МПК: MEM 1 мг/л; KOL 1 мг/л) и MEM-устойчивым штаммом (ARU552) (МПК: MEM 16 мг/л; KOL 1,5 мг/л). ФК/ФД модели, характеризующие устойчивость, были приспособлены для подсчёта бактерий в NONMEM. Окончательная модель была использована для прогнозирования гибели клеток ARU552 при различных концентрациях KOL и MEM в комбинациях. Модель с камерами для растущих и покоящихся клеток, в которых бактерицидное действие KOL снижалось при продолжительной экспозиции, а небольшая часть (0,15%) исходного инокулюма была устойчива к MEM, описывала бактерицидный эффект двух антибиотиков и развитие устойчивости. Для типичного больного была спрогнозирована ударная доза KOL в комбинации с высокой дозой MEM (2000 мг каждые 8 час), результатом чего была достигнута ясно выраженная гибель устойчивого к MEM штамма за 24 час. Разработанная ФК/ФД модель успешно описывала во времени изменение количества бактерий после экспозиции с KOL и MEM, по отдельности и в комбинации, для обоих штаммов и определяла динамическое взаимодействие антибиотиков. Выполненное исследование продемонстрировало применение ФК/ФД модели и подтвердило полезность комбинированной терапии высоких доз KOL и MEM для преодоления устойчивости к MEM.

* Department of Pharmaceutical Biosciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

РАЗРУШЕНИЕ БИОПЛЁНКИ МУКОИДНОГО ШТАММА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* OLIGOG CF-5/20, ОЛИГОМЕРОМ АЛЬГИНАТА, НА МОДЕЛИ ЛЁГочНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ.

OLIGOG CF-5/20 DISRUPTION OF MUCOID *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM IN A MURINE LUNG INFECTION MODEL / W. HENGZHUANG*, Z. SONG, O. CIOFU, E. ONSHYNEN, P. D. RYE, N. HØIBY // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY MAY 2016; 60: 5: 2620—2626.

Рост в виде биоплёнки является универсальным, эффективным и пластичным способом выживания бактерий в условиях враждебной среды. В период инфекции биоплёнка обеспечивает устойчивость и толерантность к иммунной защитной системе хозяина и антибиотикам, позволяя популяции биоплёнки выживать и процветать в условиях, когда погибает планктонная популяция. Следовательно, разрушение биоплёнки является

ключевым моментом для эрадикации персистирующих бактериальных инфекций при многих типах их хронического течения. В исследовании разрушающего биооплёнку действия альгинатного олигомера OligoG CF-5/20 были использованы методы определения *in vitro* минимальной убивающей биооплёнку концентрации (МВЕС) и *in vivo* модель хронической инфекции, сопровождающейся образованием биооплёнки. Подобного типа инфекции были инициированы внутритрахеальным введением мышам клеток мукоидного клинического штамма *Pseudomonas aeruginosa*, включённых в полимерные альгинатные частицы. Разрушение биооплёнки в лёгких инфицированных мышей под действием OligoG CF-5/20 в дозо-зависимом режиме наблюдали через 24 ч со снижением КОЕ более чем на 2,5-log. Более того, в *in vitro* определениях 5% OligoG CF-5/20 снижал МВЕС колистина с 512 мкг/мл до 4 мкг/мл. Полученные результаты подтверждают возможности OligoG CF-5/20 в качестве разрушающего биооплёнку препарата, имеющего клиническое значение для снижения микробной нагрузки при хронических инфекциях, сопровождающихся образованием биооплёнок.

* Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Denmark

* Department of Immunology and Microbiology, Costerton Biofilm Center, University of Copenhagen, Denmark.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА БИОПЛЁНОК АЗТРЕОНАМОМ И ТОБРАМИЦИНОМ — НОВЫЙ ПОДХОД В ПРЕОДОЛЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ РЕСПИРАТОРНЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ИНФЕКЦИЙ.

SEQUENTIAL TREATMENT OF BIOFILMS WITH AZTREONAM AND TOBRAMYCIN IS A NOVEL STRATEGY FOR COMBATING *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CHRONIC RESPIRATORY INFECTIONS / E. ROJO-MOLINERO*, M. D. MACIA, R. RUBIO, B. MOYA, G. CABOT, C. LÓPEZ-CAUSAPÉ, J. L. PÉREZ, R. CANTÓN, A. OLIVER // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* MAY 2016; 60: 5: 2912—2922.

Обычно хроническую колонизацию у больных муковисцидозом контролируют, используя один антибиотик в форме аэрозоля. Оценивали терапевтическую эффективность и динамику антибиотикостойчивости биооплёнок *Pseudomonas*

aeruginosa при последовательном применении ингаляции азтреонамом (АТМ) и тобрамицином (ТОВ). Для этого использовали лабораторные штаммы PAO1, PAOMS (гипермутабельный), PAOMA (мукоидный), и PAOMSA (мукоидный и гипермутабельный), а также два гипермутабельных муковисцидозных штамма, 146-HSE (ливерпульский эпидемический штамм [LES-1]) и 1089-HSE (ST1089). Образование биооплёнок происходило в проточной клеточной системе. Зрелые биооплёнки были обработаны пиковой и 1/10 пиковой концентрациями АТМ (700 мг/л и 70 мг/л), ТОВ (1000 мг/л и 100 мг/л), а также альтернативными комбинациями (АТМ/ТОВ/АТМ и ТОВ/АТМ/ТОВ) в течение 2 ($t=2$), 4 ($t=4$) и 6 дней ($t=6$). Определяли число жизнеспособных клеток и устойчивые мутанты. Динамику структурных изменений в биооплёнке отслеживали конфокальным лазерным сканирующим микроскопированием с помощью программ COMSTAT и IMARIS. Монотерапия ТОВ приводила к интенсивному снижению КОЕ, которое не всегда коррелировало со снижением биомассы и/или бактерицидным действием на биооплёнки, особенно муковисцидозных штаммов. Бактерицидный эффект АТМ был ниже, при этом установлено влияние на биомассу и структуру биооплёнки, в т.ч. волокнистость. Альтернативные варианты ТОВ и АТМ усиливали противооплёночную активность как в отношении лабораторных, так и муковисцидозных штаммов по сравнению с действием индивидуальных антибиотиков, повышая бактерицидное действие и/или снижение биомассы, особенно при пиковых концентрациях. Устойчивые штаммы не были обнаружены ни при одном режиме обработки пиковыми концентрациями, но, как ни странно, — при обработке 1/10 пиковых концентраций. Полученные данные являются основанием для клинической оценки режимов последовательной обработки антибиотиками как превосходящей применяемую в настоящее время монотерапию.

* Servicio de Microbiología and Unidad de Investigaci3n, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigaci3n Sanitaria de Palma (IdISPa), Palma de Mallorca, Spain

* Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

Подготовлено Н. С. Бондаревой (Москва)

