

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 65



3-4'2020

Научно-практический журнал

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

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

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

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.

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: 2020

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 65

3—4'2020

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора
Чл.-корр. РАН, профессор, д. б. н. Фирсов А. А.

Зам. главного редактора
профессор, д. м. н. Яковлев С. В.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Профессор, д. м. н. Белобородов В. А.
Академик РАН, профессор, д. б. н. Говорун В. М.
Чл.-корр. РАН, профессор, д. б. н. Ильина Е. Н.
Профессор, д. м. н. Клишко Н. Н.
Профессор, д. м. н. Колбин А. С.
Профессор, д. м. н. Кочеровцев В. И.
Академик РАН, профессор, д. м. н. Лобзин Ю. В.
Профессор, д. х. н. Олсуфьева Е. Н.
Д. б. н. Переверзева Э. Р.
Д. м. н. Припутневич Т. В.
Профессор, д. м. н. Руднов В. А.
Д. б. н. Садыкова В. С.
Д. х. н. Тевяшова А. Н.
Профессор, д. х. н. Тишков В. Н.
Чл.-корр. РАН, профессор, д. б. н. Тутельян А. В.
Профессор, д. м. н. Шляпников С. А.
Профессор РАН, д. х. н. Щекотихин А. Е.

Научные редакторы
К. м. н. Кузнецова С. М.
К. б. н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Клясова Г. А.
Бибилова М. В.	Ленёва И. А.
Васильев А. Н.	Митрохин С. Д.
Волжанин В. М.	Сычев Д. А.
Дмитриева Н. В.	Теу В. В.
Захарова Ю. А.	Ших Е. В.
Зуева А. П.	

**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

Original Papers

- Логонова С. Я., Шукина В. Н.,
Савенко С. В., Борисевич С. В.
Противовирусная активность препарата Кагоцел®
in vitro в отношении вируса SARS-CoV-2
Горшкова А. С., Дрюккер В. В., Сыкилинда Н. Н.
Совместное воздействие бактериофагов
и антибиотика на биоплёнку *Pseudomonas aeruginosa*
Селянская Н. А., Меньшикова Е. А.,
Курбатова Е. М., Головин С. Н.
Оценка эффективности антибиотиков в отношении *Vibrio*
cholerae в условиях формирования сложной биоплёнки
Ахалкина И. Г., Глушак А. М.,
Родионова Е. Н., Качалкин А. В.
Эффективность антифунгальных препаратов в отношении
грибов рода *Candida*, выделенных в Московском регионе

- 3** Loginova S. Ya., Shchukina V. N.,
Savenko S. V., Borisevich S. V.
Antiviral Activity of Kagocel®
in vitro Against Virus SARS-CoV-2
7 Gorshkova A. S., Drucker V. V., Sykilinda N. N.
The Combined Effect of Bacteriophages and Antibiotics
on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm
12 Selyanskaya N. A., Menshikova E. A.,
Kurbatova E. M., Golovin S. N.
Evaluation of Antibiotics Effectiveness Against *Vibrio Cholerae*
under the Conditions of Complex Biofilm Formation
16 Akhapkina I. G., Glushakova A. M.,
Rodionova E. N., Kachalkin A. V.
The Effectiveness of Antifungal Agents Against Yeasts
of *Candida* Genus Isolated in Moscow Region

В помощь практикующему врачу

Guidelines for Practitioners

- Запорожец Т. С., Крыжановский С. П., Персиянова Е. В.,
Кузнецова Т. А., Смолина Т. П., Газжа А. К., Шевченко Н. М.,
Звягинцева Т. Н., Ермакова С. П., Беседнова Н. Н.
Корректирующее действие фукоидана, сульфатированного
полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens*,
при формировании специфического иммунного ответа
против вирусов сезонного гриппа у пожилых людей
Казанова А. М., Ченкуров М. С., Копайло А. А.,
Ивжиц М. А., Зырянов С. К.
Определение эффективности антибактериальной терапии
путём проведения терапевтического
лекарственного мониторинга
Муравьева Н. В., Белов Б. С., Тарасова Г. М.
Прокальцитонинный тест в практике ревматолога

- 23** Zaporozhets T. S., Kryzhanovsky S. P., Persianova E. V.,
Kuznetsova T. A., Smolina T. P., Gazha A. K., Shevchenko N. M.,
Ermakova S. P., Zvyagintseva T. N., Besednova N. N.
The Corrective Effect of Fucoidan, a Sulfated Polysaccharide
Extracted from Brown Algae *Fucus evanescens*,
in the Formation of a Specific Immune Response
Against Seasonal Influenza Viruses in the Elderly
29 Kazanova A. M., Chenkurov M. S., Kopaylo A. A.,
Ivzhits M. A., Zyryanov S. K.
Determination of the Effectiveness
of Antibiotic Therapy by Conducting Therapeutic
Drug Monitoring
34 Muravyeva N. V., Belov B. S., Tarasova G. M.
Procalcitonin Test in Rheumatologist's Practice

Обзоры

Reviews

- Щипелева И. А., Марковская Е. И., Кретенчук О. Ф.
Антибактериальная терапия туляремии:
современное состояние и перспективы
Логонова С. Я., Шукина В. Н., Борисевич С. В.
Современное состояние профилактики
и лечения лихорадки Чикунгунья

- 39** Shchipeleva I. A., Markovskaya E. I., Kretenchuk O. F.
Antibacterial Therapy of Tularemia:
Current Status and Prospects
45 Loginova S. Ja., Shchukina V. N., Borisevich S. V.
The Modern State of Prevention
and Treatment of Chikungunya Fever

Некролог

Obituary

- Памяти А. А. Фирсова
Портной Ю. А., Голикова М. В.
Научный путь члена-корреспондента РАН,
профессора А. А. Фирсова

- 54** In Memory of A. A. Firsov
55 Portnoy Y. A., Golikova M. V.
The Scientific Path of Corresponding Member of the RAS,
Professor A. A. Firsov

* 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.

Противовирусная активность препарата Кагоцел® *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2

С. Я. ЛОГИНОВА, В. Н. ЩУКИНА, С. В. САВЕНКО, *С. В. БОРИСЕВИЧ

ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад

Antiviral Activity of Kagocel® *in vitro* Against Virus SARS-CoV-2

S. YA. LOGINOVA, V. N. SHCHUKINA, S. V. SAVENKO, *S. V. BORISEVICH

48 TSNII Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiyev Posad

Изучена противовирусная активность лекарственного препарата Кагоцел®, имеющего высокий профиль безопасности и доказанную эффективность для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ в качестве индуктора интерферонов, в отношении нового пандемического штамма SARS-CoV-2 в экспериментах *in vitro* в культуре клеток Vero C1008. Результаты исследования выявили, что при внесении субстанции Кагоцел® в культуру клеток за 1 ч до инфицирования и через 1 ч после в концентрации 5000 мкг/мл отмечалось подавление цитопатической активности вируса на 100%. Также было установлено, что Кагоцел® эффективно подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2, вариант B, в культуре клеток Vero C1008 в дозе 5000 мкг/мл на 1,75 lg, при этом коэффициент ингибирования по подавлению репродукции вируса составил 97,83%.

Ключевые слова: Кагоцел®; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; противовирусная активность.

The antiviral activity of the drug Kagocel®, which has a high safety profile and proven efficacy for the prevention and treatment of influenza and AVRI as an interferon inducer, was studied against a new pandemic strain of SARS-CoV-2 *in vitro* in Vero C1008 cell culture. The results of the study revealed that at the addition of the substance Kagocel® at the concentration of 5000 µg/ml into the cell culture 1 h before the virus infection and 1 h after, there was 100% inhibition of the cytopathic activity of the virus. It was also found that Kagocel® at the dose of 5000 µg/ml effectively suppressed the reproduction of the SARS-CoV-2 virus, variant B, in Vero C1008 cell culture by 1.75 lg, the inhibition coefficient was 97.83 %.

Keywords: Kagocel®; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; antiviral activity.

Введение

Вирусное заболевание COVID-19, которому ВОЗ присвоил категорию пандемии, уже вошла в историю как чрезвычайная ситуация мирового масштаба и привлекла к себе внимание специалистов здравоохранения и населения во всём мире [1, 2].

Значительный рост числа новых случаев инфицирования этим вирусом демонстрирует актуальность поиска лекарственных препаратов, эффективных в отношении данного возбудителя. Поиск новых лекарственных средств для проведения терапии нового заболевания является долгим и дорогостоящим процессом с высокой частотой выбывания потенциальных препаратов [3, 4]. Скорость разработки новых лекарственных средств в условиях глобальной пандемии неприемлема. В связи с этим, в сегодняшней ситуации, когда по объективным причинам современное медицинское сообщество не может предложить эффективный алгоритм профилактики и лечения коронавирусной инфекции, который бы обладал

достаточной доказательной базой, необходимо использовать комбинации лекарственных противовирусных препаратов, уже многократно доказавших свою безопасность и эффективность на штаммах ОРВИ, в т. ч. штаммах коронавирусов. Особое внимание следует уделить индукторам интерферонов [5, 6].

Лекарственный препарат Кагоцел® (таблетки 12 мг, Регистрационное удостоверение: Р N002027/01 от 09.01.2003 г.) относится к противовирусным препаратам с ИФН-индуцирующей активностью. В результате проведённых экспериментов *in vitro* и *in vivo* [7–9] была доказана интерферон-индуцирующая, иммуномодулирующая и противовирусная активности препарата Кагоцел® в профилактике и лечении гриппа и ОРВИ [5], в семейство которых входят и коронавирусы. Результаты проведённых регистрационных и пострегистрационных клинических и наблюдательных исследований показали, что применение препарата Кагоцел® как средства лечения и профилактики ОРВИ и гриппа приводило к выработке интерферонов, что позволяло эффективно проводить терапию ОРВИ вне зависимости от того, каким видом вирусов было вызвано заболевание [10–17], что указывает на возможность

применения препарата Кагоцел® для лечения и профилактики разнообразных острых респираторных вирусных инфекций, к которым относятся и коронавирусы.

Цель работы — экспериментальное изучение токсичности и противовирусной активности фармацевтической субстанции Кагоцел® *in vitro* в отношении коронавируса SARS-CoV-2 (COVID-19).

Материал и методы

Культура клеток и среды. Эксперименты проводили на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки — Vero C1008. В качестве ростовой и поддерживающей применяли среду Игла (MEM) на солевом растворе Хенкса, содержащую, соответственно, 7,5% и 2% фетальной телячьей сыворотки.

Вирус. В работе использовали вирус SARS-CoV-2, вариант В, полученный в 2020 г. из ФГБУ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и хранившийся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Биологическая активность полученного вирусного препарата составляла 7,4 lg БОЕ/мл и 6,5 lg ЦПД₅₀/мл, посторонняя микрофлора отсутствовала.

Исследуемый препарат. Препарат Кагоцел®, субстанция-порошок аморфный, серия 1670918 от 27.09.2018, годен до 09.2022, был предоставлен ГК «НИАРМЕДИК». Стартовый раствор препарата для оценки токсичности для культуры клеток Vero C1008 (10 мг/мл) готовили следующим образом: 10 мг субстанции Кагоцел® растворяли в 9 мл поддерживающей среды в течение 2 ч, pH доводили до 7 раствором 1 М HCl, а затем поддерживающей средой до объёма 10 мл. Фильтровали через насадки шприцевые Minisart® High Flow, диаметр пор 0,22 мкм, «Sartorius Stedim Biotech», кат. № 16541-K. Далее готовили разведения двукратным шагом на поддерживающей среде.

Оценка биологических свойств возбудителя SARS-CoV-2. Биологическую активность оценивали титрованием вирусосодержащей суспензии в культуре клеток Vero C1008 по цитопатическому действию вируса.

Оцениваемые параметры. Оценка противовирусной эффективности экспериментальных субстанций осуществлена в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России [18].

Коэффициент ингибирования (КИ, %) рассчитывался по формуле:

$$\text{КИ} = ((A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}) / A_{\text{контр}}) \times 100\%, \text{ где:}$$

$A_{\text{контр}}$ — биологическая активность вируса, определённая в клетках без внесения химиопрепарата, ЦПД;

$A_{\text{оп}}$ — биологическая активность вируса, определённая в клетках с внесением химиопрепарата, ЦПД.

Основным критерием оценки эффективности препаратов *in vitro* является коэффициент ингибирования цитопатогенного действия вируса (КИ, %).

Схема внесения исследуемых препаратов. Рибавирин® и Интерферон альфа-2b вносили через 1 ч после инфицирования клеток. Субстанцию Кагоцел® в различных концентрациях добавляли к монослою Vero C1008 два раза: за 1 ч до инфицирования клеток и через 1 ч после. Для этого ростовую среду удаляли с монослоя, вносили исследуемые образцы в концентрации 5 мг/мл и далее, разведённые 2-кратным шагом, через 1 ч инокулят удаляли, трижды промывали поддерживающей средой. После этого вносили вирус SARS-CoV-2, инкубировали в течение 60 мин при

температуре 37±0,5°C, затем инокулят удаляли, промывали, вносили свежую среду, содержащую исследуемые образцы в концентрации 5 мг/мл и далее, разведённые 2-кратным шагом. Инкубировали при температуре 37±0,5°C в течение 48 ч.

Культуру клеток инфицировали в дозах 10 ЦПД₅₀ или 100 ЦПД₅₀. Влияние на цитопатогенность вируса оценивали через 24 и 48 ч после инфицирования. Для каждой исследуемой концентрации препарата Кагоцел® использовали по 4 пробирки с монослоем клеток, в трёх независимых опытах (всего пробирок — 12).

Анализ данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты исследования

Результаты изучения токсичности субстанции препарата Кагоцел® для культуры клеток почки африканской зелёной мартышки Vero C1008 выявили, что данное соединение в концентрации 10000 мкг/мл не вызывает деструкцию монослоя и разрушение клеток. Максимальная переносимая концентрация (МПК) для субстанции препарата Кагоцел® составила более 10000 мкг/мл (табл. 1). Следовательно, максимальная стартовая концентрация (1/2 МПК) препарата Кагоцел® для оценки противовирусной активности составила ≥ 5 мг/мл. Кагоцел® является крайне малотоксичным соединением.

Изучение противовирусной активности субстанции Кагоцел® проводили в культуре клеток Vero C1008, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант В, по показателю коэффициента ингибирования цитопатической активности вируса и репродукции вируса.

Через 24 ч инкубирования после инфицирования клеток (в дозе 10 ЦПД₅₀) при внесении препарата Кагоцел® в диапазоне концентраций 156 мкг/мл — 5000 мкг/мл цитопатический эффект вируса не был выявлен. В контрольной группе клеток деструкцию монослоя наблюдали в 50% случаях, поэтому КИ составило более 50%. Даже при 10-кратном увеличении дозы инфицирования (доза 100 ЦПД₅₀) препарат Кагоцел® в диапазоне концентраций 625—5000 мкг/мл полностью подавлял цитопатическую активность вируса SARS-CoV-2, вариант В (КИ в данном случае составил 75%). Ингибирование цитопатической активности вируса в концентрациях 156—313 мкг/мл при этом составило 67 % (табл. 2). В этих же условиях референс-препараты в используемых концентрациях полностью подавляли цитопатическую активность вируса как при инфицировании в дозе 10 ЦПД₅₀, так и в дозе 100 ЦПД₅₀ (см. табл. 2).

Через 48 ч инкубирования после инфицирования клеток в дозе 10 ЦПД₅₀ при внесении пре-

Таблица 1. Результаты оценки токсичности субстанции препарата Кагоцел® для культуры клеток Vero C1008

Препарат	Токсическая концентрация препарата, ЦПД ₅₀ , мг/мл	МПК, мг/мл $X \pm \sigma_x$	1/2МПК, мг/мл $X \pm \sigma_x$
Кагоцел®	> 10,0	> 10,0±0,0	> 5,0±0,0
Контроль среды	отсутствует	—	—

Таблица 2. Результаты оценки противовирусной активности препарата Кагоцел® в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008

Название	Концентрация, мкг/мл	24 ч после инфицирования				48 ч после инфицирования			
		10 ЦПД ₅₀		100 ЦПД ₅₀		10 ЦПД ₅₀		100 ЦПД ₅₀	
		Частота ЦПД	КИ, %	Частота ЦПД	КИ, %	Частота ЦПД	КИ, %	Частота ЦПД	КИ, %
Кагоцел®	5000	0/12	>50	0/12	>75	0/12	100	12/12	0
	2500	0/12	>50	0/12	>75	3/12	75	12/12	0
	1250	0/12	>50	0/12	>75	12/12	0	12/12	0
	625	0/12	>50	0/12	>75	12/12	0	12/12	0
	312	0/12	>50	3/12	67	12/12	0	12/12	0
	156	0/12	>50	3/12	67	12/12	0	12/12	0
Рибавирин®	100	0/12	>50	0/12	>75	0/12	100	1/12	91,7
Интерферон альфа-2b	10**	0/12	>50	0/12	>75	0/12	100	0/12	100
Вирусный контроль	—	6/12	—	9/12	—	12/12	—	12/12	—
Контроль среды	—	0/12	—	0/12	—	0/12	—	0/12	—

Примечание. Здесь и в табл. 3: * — концентрация интерферона альфа-2b в МЕ/мл.

Таблица 3. Результаты оценки противовирусной активности препарата Кагоцел® в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008, по подавлению репродукции вируса

Название	Концентрация, мкг/мл	Накопление вируса, lg БОЕ/мл, $X \pm \sigma_x$	Подавление репродукции вируса, Δ , lg	Коэффициент ингибирования (КИ), %
Кагоцел®	5000	5,45±0,07	1,75	97,83
	2500	6,40±0,15	0,80	80,00
	1250	6,99±0,05	0,21	37,37
	625	7,20±0,04	0	0
	313	7,20±0,04	0	0
	156	7,20±0,04	0	0
Рибавирин®	100	5,03±0,15	2,17	99,31
Интерферон альфа-2b	10**	0	7,20	100
Контроль инфицирующей дозы	—	7,20±0,04	—	—
Контроль среды	—	—	—	—

парата Кагоцел® в концентрации 5000 мкг/мл цитопатический эффект вируса не был выявлен (КИ равен 100%), в концентрации 2500 мкг/мл — подавление цитопатической активности вируса составило 75%, а в диапазоне концентраций 156–1250 мкг/мл препарат не оказывал защитного действия на клеточную культуру. При высокой дозе инфицирования, равной 100 ЦПД₅₀, препарат Кагоцел® не влиял на цитопатическую активность вируса SARS-CoV-2, вариант В, во всем диапазоне изученных концентраций (см. табл. 2). При этом интерферон альфа-2b подавлял цитопатическое действие вируса на 100% как при 10 ЦПД₅₀, так и при 100 ЦПД₅₀, в отличие от альфа-2b Рибавирина. Данный препарат полностью защищал монослой только при дозе инфицирования 10 ЦПД₅₀, а при 100 ЦПД₅₀ его протективные свойства начинали снижаться, и КИ составил только 91,7%.

Снижение противовирусной активности Кагоцела на сроке 48 ч инкубации, по сравнению со сроком 24 ч, может говорить об особенностях механизма его действия и метаболизма в клетке. Не все препараты имеют такую кинетику противовирусного действия в отношении инфекции SARS-CoV-2. Например, хлорохин фосфат и гидроксихлорохин более активны при их инкубировании с клетками Vero в течение 48 ч, по сравнению с 24 часами инкубации [19]. Теоретически, разный

способ действия различных препаратов может оказывать синергидное действие при их комбинированном применении и повышать таким образом эффект лечения.

Также было проведено изучение влияния исследуемой субстанции Кагоцел® на репродукцию вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008 при дозе инфицирования 10 ЦПД₅₀. Учёт результатов через 48 ч после инфицирования. Результаты представлены в табл. 3.

Следовательно, Кагоцел® эффективно подавляет цитопатическую активность вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008 в диапазоне концентраций 2500–5000 мкг/мл.

Дополнительно, по результатам, учтённым через 48 ч после инфицирования, была проведена оценка 50% ингибирующей концентрации препарата Кагоцел® в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008 (табл. 4).

Из табл. 4 следует, что при дозе инфицирования 10 ЦПД₅₀ оба метода определения противовирусной активности (по ЦПД и по подавлению репродукции вируса) позволяют определить 50% ингибирующую концентрацию Кагоцела, причём получаемые значения практически идентичны и колеблются около среднего значения 2288,5 мкг/мл. Хотя в рамках данной работы не выявлена токсическая концентрация Кагоцела, в связи с чем макси-

Таблица 4. Результаты оценки эффективной дозы препарата Кагоцел® в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008

Препарат	50% ингибирующая концентрация (ЕД ₅₀), мкг/мл (по Першину)		
	по подавлению ЦПД		по подавлению репродукции
	при инфицировании в дозе		при инфицировании в дозе
	10 ЦПД ₅₀	100 ЦПД ₅₀	10 ЦПД ₅₀
Кагоцел®	2344	Защита отсутствует	2231

мально переносимая концентрация для культуры Vero C1008 не была установлена, очевидно, что химиотерапевтический индекс для Кагоцела будет достаточно высоким.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я., Янковская Я.Д., Бузова С.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. Архив внутренней медицины. — 2020. — Т. 10. — № 2. — С. 87–93. / Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya. et al. New Coronavirus Infection (Covid-19): Clinical and Epidemiological Aspects. The Russian Archives of Internal Medicine. 2020; 10 (2): 87–93. doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93
2. Li Guangdi, Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). Nature Reviews Drug Discovery 2020; 19: 149–150. doi: 10.1038/d41573-020-00016-0.
3. Lythgoe M.P. et al. Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future. Pharmacology and Therapeutics 2016; 164: 195–203. doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.012
4. Lythgoe M.P., Middleton P. Ongoing clinical trials for the management of the COVID-19 pandemic. Trends in Pharmacological Sciences 2020; https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.03.006.
5. Сологуб Т.В., Цветков В.В. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. Терапевтический архив. — 2017. — Т. 89. — № 8. — С. 113–119 / Sologub T.V., Tsvetkov V.V. Kagocel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: Data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials Therapeutic archive 2017; 89 (8): 113–119 [in Russian].
6. Borovskaya T. G. Preclinical and clinical evidence of safety of antiviral drug with immunomodulatory activity. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2018; 3 (19): 271–276.
7. Федякина И.Т., Коноплева М.В., Прошина Е.С., Линник Е.В., Никитина Н.И. Противовирусное действие субстанции «Кагоцел» in vitro в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2. Вопросы Вирусологии. — 2019. Т. 64. — № 3. С. 125–131. doi: http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-4-125-131. / Fediakina I.T., Konopleva M.V., Proshina E.S., Linnik E.V., Nikitina N.I. Antiviral effect of «Kagocel» substance in vitro on influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2. Problems of Virology 2019; 64 (3): 125–131. doi: 10.18821/0507-4088-2019-64-3-125-131
8. Зарубаев В.В., Гаршинина А.В., Слита А.В., Беляевская С.В., Лаврентьева И. Н. Противовирусная активность Кагоцела на модели летальной гриппозной инфекции. Антибиотики и химиотерапия. — 2020. — Т. 65. — № 1–2. — С. 3–7. / Zarubaev V. V., Garshinina A. V., Slita A. V., Belyaevskaya S. V., Lavrentieva I. N. Antiviral Activity of Kagocel® on the Model of Experimental Lethal Influenza Infection. Antibiotiki i khimioter 2020; 65 (1–2): 3–7. [in Russian].
9. Галегов Г.А., Наровлянский А.Н., Сарымсаков А.А., Мезенцева М.В., Полонский В.О., Гомес Л.А., Нестеренко В.Г., Еришов Ф.И. Действие препарата «Кагоцел» на — репродукцию вируса герпеса. Вопросы вирусологии. — 2002. — Т. 47. — № 4. — С. 42–44. / Galegov G.A., Narovlyanskii A.N., Sarymsakov A.A., Mezentsseva M.V., Polonskii V.O., Gomes L.A., Nesterenko V.G., Ershov F.I. The effect of Kagocel on herpes virus reproduction. Problems of Virology 2002; 47 (4): 42–44. [in Russian]
10. Харламова Ф.С., Учайкин В.Ф., Бевза С.Л., Еришов Ф.И., Нестеренко В.Г., Сергеева Э.М. и др. Клиническая эффективность Кагоцела при ОРВИ со стенозирующим ларинготрахеитом у детей. Детские инфекции. — 2008. — № 4. — С. 28–35 / Kharlamova F.S., Uchaikin V.F., Bevza S.L., Ershov F.I., Nesterenko V.G., Sergeeva E.M. et al. Clinical efficacy of Kagocel in treatment for acute respiratory virus

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник НИО ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад

Шукина Вероника Николаевна — к. б. н., научный сотрудник НИО ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад

Таким образом, препарат Кагоцел® эффективно подавляет размножение нового коронавируса *in vitro* и является одним из перспективных лекарственных препаратов в отношении COVID-19.

infections (ARVI) in children with constrictive laryngotracheitis. Detskie infekcii 2008; 4: 28–35 [in Russian].

11. Савенкова М.С., Исаева Е.И., Карашина О.В., Шабат М.Б., Красева Г.Н. и др. Анализ сравнительного лечения ОРВИ в эпидсезонах 2015–2016 г. на основе результатов мультиплексной ПЦР-диагностики в условиях амбулаторной практики. Фарматека. — 2017. — № 1. — С. 38–45 / Savenkova M.S., Isaeva E.I., Karashina O.V., Shabat M.B., Kraseva G.N. et al. Comparative analysis of treatment of ARVI in the 2015–2016 epidemic season based on the results of the multiplex PCR-RT diagnostics in outpatient practice. Pharmateka 2017; 1: 38–45 [in Russian].
12. Вартамян Р.В., Сергеева Э.М., Чешик С.Г. Оценка терапевтической эффективности препарата Кагоцел® у детей младшего и дошкольного возраста с острыми респираторными вирусными инфекциями. Детские инфекции. — 2011. — № 1. — С. 36–41. / Vartanyan R.V., Sergeeva E.M., Cheshik S.G. Evaluation of therapeutic efficacy of Kagocel® preparation in children of early and preschool age with acute respiratory viral infections. Detskie infekcii 2011; 1: 36–41 [in Russian].
13. Харламова Ф.С., Кладова О.В., Сергеева Э.М., Щербакоева А.А., Яблонская К.П., Легкова Т.П. и др. Клиническая эффективность препарата Кагоцел® при гриппе и ОРВИ у детей с 2 до 6 лет. Детские инфекции. — 2010. — № 4. — С. 34–41. / Kharlamova F.S., Kladova O.V., Sergeeva E.M., Shcherbakova A.A., Yablonskaya K.P., Legkova T.P. Clinical efficacy of Kagocel® preparation for Treatment of Influenza and ARVI in Children Aged 2 to 6 Years. Detskie infekcii 2010; 4: 34–41 [in Russian].
14. Меркулова Л. Н., Колобухина Л. В., Кистенев Л. Б., Исаева Е. И., Бурцева Е. И., Лукьянова Н. А. и др. Терапевтическая эффективность Кагоцела при лечении больных неосложнённым гриппом и гриппом, осложнённым ангиной. Клиническая фармакология и терапия. — 2002. — Т. 11. — № 5. — С. 21–23. / Merkulova L.N., Kolobukhina L.V., Kisteneva L.B., Isaeva E.I., Burtseva E. I., Lkyanova N.A. et al. The therapeutic efficacy of Kagocel in cases of uncomplicated influenza and influenza complicated by angina. Clinical Pharmacology and Therapy 2002; 11(5): 21–23 [in Russian].
15. Бабаченко И.В., Шарипова Е.В., Беликова Т.Л. Подходы к терапии ОРВИ у детей в стационаре и поликлинике Медицинский совет. — 2017. — № 1. — С. 94–99 / Babachenko I.V., Sharipova E.V., Belikova T.L. Hospital and clinic-based approaches to the treatment of ARVI in children Medical advice 2017; 1: 94–99 [in Russian].
16. Еришов Ф.И., Наровлянский А.Н. Теоретические и прикладные аспекты системы интерферонов: к 60-летию открытия интерферонов. Вопросы вирусологии. — 2018. — Т. 63. — № 1. — С. 10–18. / Ershov F. I., Narovlyanskii A.N. Theoretical and applied aspects of the interferon system: to the 60th anniversary of the discovery of interferons. Problems of Virology 2018; 63 (1): 10–18 [in Russian].
17. Еришов Ф.И., Наровлянский А.Н. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях. Вопросы вирусологии. — 2015. — Т. 60. — № 2. — С. 5–10. / Ershov F. I., Narovlyanskii A.N. Usage of interferon inducers during viral infections. Problems of Virology 2015; 60 (2): 5–10 [in Russian].
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К. 2012. — 944 с. / Manual for non-clinic investigations of drugs. Part 1. M.: Grif and K. 2012; 944.
19. Yao X., Ye F., Zhang M., Cui C., Huang B., Niu P. et al. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Clin. Infect. Dis 2020; Mar 9. pii: ciaa237. doi: 10.1093/cid/ciaa237

Савенко Сергей Владимирович — научный сотрудник НИО ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад
Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, начальник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад

Совместное воздействие бактериофагов и антибиотика на биоплёнку *Pseudomonas aeruginosa*

*А. С. ГОРШКОВА¹, В. В. ДРЮККЕР¹, Н. Н. СЫКИЛИНДА²

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

² Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

The Combined Effect of Bacteriophages and Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm

*A. S. GORSHKOVA¹, V. V. DRUCKER¹, N. N. SYKILINDA²

¹ Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow

В настоящее время по-прежнему остро стоит проблема нозокомиальных инфекций. Одним из ключевых возбудителей такого рода заболеваний является *Pseudomonas aeruginosa*. Перспективность использования бактериофагов в профилактике и борьбе с инфекционными заболеваниями сейчас активно изучается. Целью исследования было изучение воздействия новых бактериофагов на биоплёнку *Pseudomonas aeruginosa* при совместном использовании с антибиотиком гентамицином. Клетки лабораторного эталонного штамма *P.aeruginosa* PAO1 выращивали в 96-луночных планшетах в течение суток, образовавшиеся биоплёнки обрабатывали антибиотиком гентамицином в различных концентрациях, а также бактериофагами AN14 и AN1. Степень деградации биоплёнки оценивали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Используемые новые литические бактериофаги AN14 (семейство *Siphoviridae*), AN1 (семейство *Myoviridae*) продемонстрировали выраженную антибиоплёночную активность в первые сутки воздействия на биоплёнку *P.aeruginosa* ($p < 0,001$). Эффект разрушительного воздействия гентамицина на биоплёнку возрастал с ростом концентрации антибиотика в диапазоне 2–16 мкг/мл. Добавление литических бактериофагов AN14 и AN1 усиливало действие антибиотика ($p = 0,05$). Таким образом, совместное использование литических бактериофагов и антибиотиков приводило к более эффективной эрадикации биоплёнки, чем каждым антибактериальным агентом отдельно.

Ключевые слова: бактериофаги, *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотики, биопленки.

Currently, the problem of nosocomial infections is of urgent concern. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the key causative agents of this type of disease. The prospect of using bacteriophages in the prevention and control of infectious diseases is now being actively studied. The aim of the work is to study the effect of new bacteriophages on *P.aeruginosa* biofilm when used together with the antibiotic gentamicin. Cells of the laboratory reference strain *P.aeruginosa* PAO1 were grown in 96-well plates for a day, the resulting biofilms were treated with gentamicin in various concentrations, as well as bacteriophages AN14 and AN1. The degree of biofilm degradation was evaluated by staining the cells with crystal violet dye. The new lytic bacteriophages AN14 (*Siphoviridae* family), AN1 (*Myoviridae* family) used in the study, showed pronounced antibiofilm activity on the first day of exposure to *P.aeruginosa* biofilm ($p < 0.001$). The destructive effect of gentamicin on biofilms increased when the concentration of the antibiotic was increased in the range of 2–16 mg/ml. Addition of lytic bacteriophages AN14 and AN1 enhanced the effect of the antibiotic ($p = 0.05$). Thus, the combined use of lytic bacteriophages and antibiotics led to a more effective eradication of biofilms than when used separately.

Keywords: bacteriophages, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, biofilms.

Введение

Широко известный факт, что бактерии *Pseudomonas aeruginosa* являются причиной оппортунистических инфекций и участвует в развитии инфекционных осложнений в отделениях реанимации и интенсивной терапии, доминируя в

этиологии нозокомиальной пневмонии, связанной, в основном, с искусственной вентиляцией лёгких и пневмонии при муковисцидозе [1].

В последнее время возрастает интерес к вирусам бактерий — бактериофагам, и проведён широкий ряд независимых исследований в различных лабораториях мира, посвящённых взаимодействию бактериофагов и бактерий. Полученные наблюдения дают основания полагать, что фаги представляют определённый интерес для терапии инфекционных заболеваний [2–4]. Кроме того,

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: e-mail: kovadlo@yandex.ru

клинические испытания на людях демонстрируют превосходные результаты: пациент 15 лет с муковисцидозом с инфекцией *Mycobacterium abscessus* лечился трёхфазным коктейлем фагов после двусторонней трансплантации лёгких. Производные литического фага, которые эффективно убивали инфекционный штамм *M.abscessus*, были разработаны с помощью геной инженерии. Внутривенное лечение фагом хорошо переносилось и ассоциировалось с объективным клиническим улучшением, включая закрытие стеральной раны, улучшение функции печени и значительное устранение инфицированных узлов кожи. Авторы не исключали вероятность того, что успешное лечение пациента произошло бы и без лечения фагом. Тем не менее, в работе отмечалось, что пациенты с подобными клиническими состояниями обычно имеют высокую смертность, и что улучшение не было связано с прекращением или началом приёма других лекарств. Кроме того в поддержку доказательства роли бактериофагов в выздоровлении больного является доказательство репликации фага *in vivo* [5].

Ранее мы обнаружили, что бактериофаги помогают значительно снизить минимальную ингибирующую и бактерицидную концентрации антибиотиков (гентамицина и ципрофлоксацина) у *P.aeruginosa* [6]. Эти наблюдения были проведены на планктонных клетках, поэтому необходимо было определить, какое воздействие оказывают бактериофаги совместно с антибиотиками на клетки, существующие в виде биоплёнки.

Цель работы — изучение влияния фагов в комбинации с антибиотиком на биоплёнку *P.aeruginosa*.

Материал и методы

Для всех экспериментов использовались эталонные штаммы *P.aeruginosa* PAO1 (из коллекции проф. В. Н. Крылова, НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва и коллекции лаборатории генов технологий Католического университета, г. Лёвен, Бельгия).

Штамм AN1 (семейство *Myoviridae*) был выделен из очистных сооружений г. Иркутска, AN14 (семейство *Siphoviridae*) — из реки Селенги. Оба штамма имели прозрачные зоны лизиса (рис. 1), что указывает на литический тип жизненного цикла используемых штаммов и зону ореола вокруг зоны лизиса, что предположительно говорит о наличии активности, деполимеризующей внеклеточные полимерные вещества *P.aeruginosa*.

Был использован антибиотик гентамицин (производство «Белмедпрепараты»).

Эксперимент по воздействию фагов на биоплёнку был проведён согласно общепринятой методике с использованием микротитровальных планшетов [7]. Биоплёнки выращивали в течение 24 ч в 96-луночных планшетах при 37°C. В качестве питательной среды использовали LB: триптон — 1%, дрожжевой экстракт — 0,5%, NaCl — 1%. После культивирования питательную среду отбирали и лунки промывали физиологическим раствором для удаления неприкреплённых клеток. Затем к биоплёнкам добавляли различные варианты: гентамицин в различных концентрациях (2, 4, 8, 16 мкг/мл), бактериофаги AN1, AN14 в количестве 10⁷ БОЕ на 1 лунку (бляшко-образу-

ющие единицы). Перед экспериментом бактериальная культура тестировалась на чувствительность к бактериофагам методом двухслойного агар, а фаговая суспензия проверялась на бактериальную стерильность посевом на среду LB. Эксперименты были проведены в 3–5-кратных повторностях. В качестве положительного контроля выступали клетки *P.aeruginosa* в среде LB, в качестве отрицательного контроля — среда LB без клеток.

Культивирование биоплёнок с фагами, гентамицином и их комбинацией проводили в термостате при 37°C в течение 20–24 ч. Затем питательную среду и планктонные клетки отбирали и лунки промывали физиологическим раствором, сушили и окрашивали 0,4% водным раствором кристаллического фиолетового. После 15-минутного окрашивания планшеты промывали так, что в лунках с отрицательным контролем не оставалось неспецифически связавшегося красителя. После просушивания в каждую лунку добавляли 96% этанол и оставляли экстрагироваться в течение 20 мин. После оптическую плотность раствора измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны 590 нм.

Минимальную ингибирующую и минимальную бактерицидную концентрации определяли согласно Методическим указаниям 4.2.1890-04.

Статистическую значимость различий между данными оптической плотности кристаллического фиолетового контрольных биоплёнок и обработанных фагами оценивали *t*-критерием Стьюдента. Непараметрический критерий Манна–Уитни применяли для оценки различий между биоплёнками с антибиотиками различных концентраций и ими же с добавлением бактериофагов.

Результаты исследования

Бактериофаг AN14 определён как представитель рода *Yuavirus*, семейство *Siphoviridae*, порядок *Caudovirales* (рис. 2, а). Его геном (№ KX198613.1 в GenBank), также как и геномы других представителей этого рода, содержит ген интегразы. Однако для этих фагов не удалось получить лизогенные штаммы [8], и их геном не обнаруживается в составе бактериального генома *P.aeruginosa* в качестве профага. Поэтому фаги этого рода относят к литическим. Бактериофаг AN1 относится к гигантским фагам *P.aeruginosa* — роду ϕ KZ (рис. 2, б).

Перед проведением эксперимента по воздействию фагов и антибиотиков на биоплёнку мы убедились, что используемый штамм обра-



Рис. 1. Зоны лизиса фагов AN14, AN1 через 5 сут роста. Отдельные бляшки могут достигать 6 мм за счёт зоны ореола.

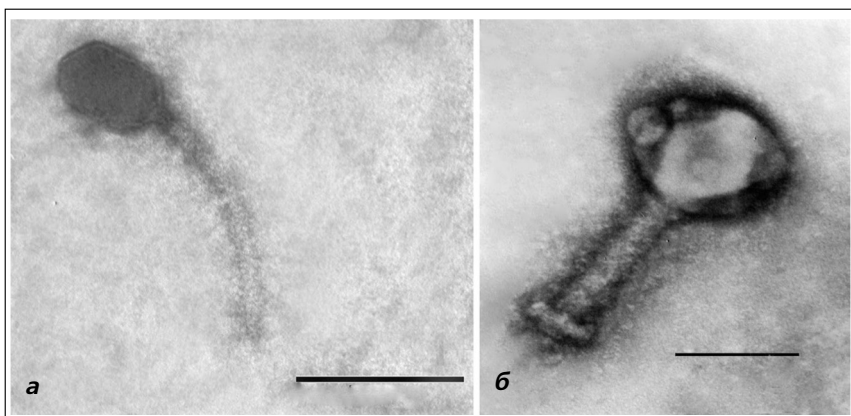


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия (шкала 100 нм). а — штамм AN14; б — штамм AN1.

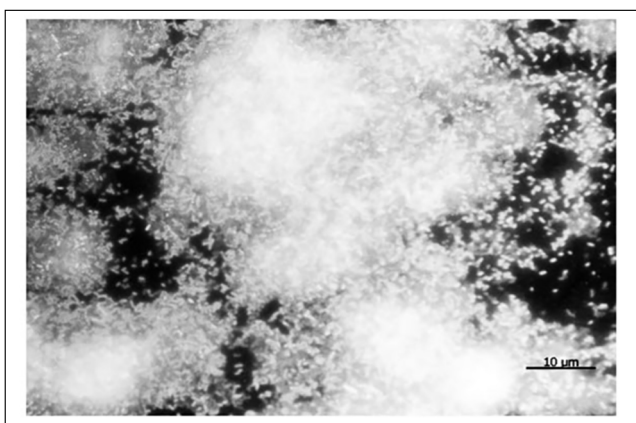


Рис. 3. Эпифлуоресцентная микроскопия биоплёнки *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 на покровных микроскопических стеклах, окраска ДАФИ.

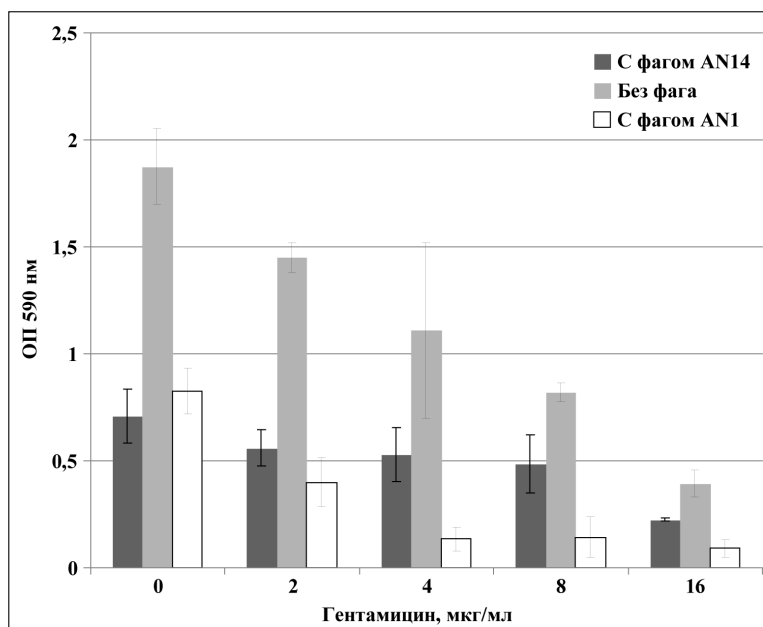


Рис. 4. Влияние различных концентраций гентамицина в комбинации с бактериофагами AN1 и AN14 на биоплёнку *P. aeruginosa* PAO1.

Столбики отражают средние результаты и стандартное отклонение измерений количества красителя, специфически связанного с биопленкой *P. aeruginosa* в различных вариациях эксперимента.

зует биоплёнки в течение 24 ч. На рис. 3 показана культура *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 на стекле после культивирования в течение 24 ч при 37°C в жидкой среде LB. Видны типичные для биоплёнок *P. aeruginosa* микроколонии. Такая суточная биоплёнка была обработана различными концентрациями гентамицина в сочетании с бактериофагами. На рис. 4 представлены средние показатели и стандартное отклонение трёх независимых экспериментов 2 штаммов *P. aeruginosa* PAO1.

Из рис. 4 видно, что за сутки инкубации бактериофаги AN14 и AN1 значительно сократили биоплёнку — в среднем на 60% ($p < 0,001$). Этот показатель сопоставим с данными по антибиоплёночной активности коктейля из фагов семейств *Myoviridae* и *Podoviridae*, полученных на нескольких десятках штаммов, выделенных у больных риносинуситом [9].

Также в результате работы стало ясно, что бактериофаги AN1, AN14 и гентамицин деградируют биоплёнку *P. aeruginosa* эффективнее при совместном использовании ($p = 0,05$). Интересно, что в аналогичном исследовании с использованием *P. aeruginosa* PA14 и Pb-подобного и SN-подобного бактериофагов не было получено положительного совместного эффекта с гентамицином при выращивании биоплёнок в пластиковых

планшетах, но был положительный результат на эпителиальных клетках [10]. Возможно, это связано с тем, что взаимодействие различных штаммов фагов и бактерий в значительной степени специфично [11].

Результаты эксперимента показали, что используемые бактериофаги и антибиотик способны значительно сократить биоплёнку *P. aeruginosa* — в среднем на 90% при концентрации гентамицина 16 мкг/мл. Важно отметить, что через 24–48 ч экспозиции с антибиотиком и вирусами в культуре появляются устойчивые клетки, которые восстанавливают численность бактерий до контрольного уровня. В планктонной культуре также как и на биоплёнках по отдельности фаги и антибиотики при определённой концентрации снижали численность бактериальной популяции. Совместное воздействие бактериофагов и антибиотиков при той же концентрации антибиотика приводило к полному

Определение минимальной бактерицидной концентрации гентамицина в отношении планктонных клеток *P.aeruginosa* PAO1

Штаммы	Сутки	Гентамицин, мкг/мл							
		0	2	4	8	16	32	64	128
PAO1	1-е	+	—	—	—	—	—	—	—
	2-е	+	+	+	+	—	—	—	—
	5-е	+	+	+	+	+	—	—	—
PAO1 + бактериофаг AN1	1-е	—	—	—	—	—	—	—	—
	2-е	+	+	—	—	—	—	—	—
	5-е	+	+	+	—	—	—	—	—

Примечание. «+» — визуально определяемый рост по помутнению среды; «—» — отсутствие роста, жидкая питательная среда прозрачная.

уничтожению бактериальных клеток за промежуток времени, за который не успевали появляться фагоустойчивые и антибиотикоустойчивые клетки (таблица). Метод, используемый для оценки деградации биоплёнок, не позволяет оценить количество оставшихся жизнеспособных клеток, поэтому остаётся не ясным при какой концентрации антибиотика происходит эрадикация биоплёнки и происходит ли вообще.

Также было обнаружено, что с ростом концентрации антибиотика уменьшался суммарный эффект с фагом. Подобное наблюдалось и в других работах: восьмикратная и однократная концентрация антибиотика тобрамицина с фагами не отличались по эффекту, что авторы объяснили тем, что при более высокой концентрации антибиотика становится затруднительным размножение фага [10].

Механизм синергетического эффекта антибиотиков и фагов пока до конца не понятен. Однако существуют предположения, что в результате выработки фагоустойчивости у клеток одновременно с этим ослабляется устойчивость к антибиотикам [12]. Нами было проведено определение МИК фагоустойчивой культуры *P.aeruginosa*, выделенной после культивирования с бактериофагом. Оказалось, что минимальная ингибирующая концентрация антибиотика была идентичной у чувствительного и нечувствительного к фагу варианта.

Единой характеристикой для большинства фагов является свойство появления фагоустойчивых вариантов, что приводит к восстановлению бактериальной популяции. Решением этой проблемы специалисты в фаговой терапии пред-

лагают использование смеси из бактериофагов, использующих различные рецепторы на поверхности клеточной стенки. Этот подход позволяет увеличить время появления фагоустойчивых вариантов. Более того, предлагается использовать последовательно несколько коктейлей фагов, что даёт ещё больше времени для контроля над фаговой популяцией для выработки иммунного ответа организма [13].

Заключение

Основным результатом нашего исследования является доказательство способности новых бактериофагов *P.aeruginosa* AN1 и AN14 разрушать сформировавшуюся биоплёнку, а также их положительного взаимодействия с антибиотиком гентамицином в разрушении биоплёнки. Это говорит о том, что применение более низких концентраций антибиотика совместно с фагом может иметь тот же антибактериальный эффект, что и высокие дозы антибактериального препарата, имеющего тяжёлые побочные эффекты.

Проведённые нами исследования вносят вклад в совместные усилия по изучению влияния бактериофагов на биоплёнку бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Полученные данные с использованием новых бактериофагов расширяют и углубляют понимание данного вопроса.

Источник финансирования. Работа выполнена по госбюджетному проекту АААА-А16-116122110061-6.

Благодарности. Выражаем благодарность ЦКП «Ультрамикроанализ» ЛИН СО РАН за предоставление трансмиссионного электронного микроскопа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2015. — Т. 17. — № 3. — С. 170–186. / Lazareva A.V., Chebotar' I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' V.I., Mayanskij N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: patogennost', patogenez i patologiya. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2015; 17 (3): 170–186. [in Russian]
2. Waters E.M., Neill D.R., Kaman B., Sahota J.S., Clorie M.R.J., Winstanley C. et al. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. Thorax 2017; 72 (7): 666–667.
3. Danis-Wlodarczyk K., Vandenheuvel D., Jang H. B., Briers Y., Olszak T., Arabski M. et al. A proposed integrated approach for the preclinical eval-

uation of phage therapy in *Pseudomonas* infections. Scientific reports 2016; 28115 (6). doi.org/10.1038/srep28115

4. Alves D.R., Perez-Esteban P., Kot W., Bean J. E., Arnot T., Hansen L. H. et al. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. Microb Biotechnol 2015; 9 (1): 61–74.
5. Dedrick R. M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Soothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. Nature Medicine 2019; 25: 730–733.
6. Горшкова А.С., Сыкилинда Н.Н., Дрюккер В.В. Эффект бактериофагов на повышение чувствительности клеток *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам. Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов 'Симбиоз-

- Россия 2013', Иркутск. Издательство 'Аспринт', 2013. — С. 68–69. / Gorshkova A.S., Sykilinda N.N., Drjyukker V.V. Effekt bakteriofagov na povyshenie chuvstvitel'nosti kletok *Pseudomonas aeruginosa* k antibiotikam. Sbornik tezisov VI Vserossiyskogo s mezhdunarodnym uchastiem Kongressa molodykh uchenykh-biologov 'Simbioz-Rossiya 2013', Irkutsk. Izdatel'stvo 'Asprint', 2013; 68–69.
7. Knezevic P., Petrovic O. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. J Microbiol Methods 2008; 74 (2–3), 114–118.
 8. Ceysens P.J., Mesyanzhinov V., Sykilinda N., Briers Y., Roucourt B., Lavigne R., Robben J., Domashin A., Miroshnikov K., Volckaert G., Hertveldt K. The genome and structural proteome of YuA, a new *Pseudomonas aeruginosa* phage resembling M6. J Bacteriol 2008; 190 (4): 1429–1435.
 9. Fong S.A., Drilling A., Morales S., Cornet M.E., Woodworth B.A., Fokkens W. J. Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7 (418). doi:10.3389/fcimb.2017.00418
 10. Chaudhry W.N., Concepcion 'n-Acevedo J., Park T., Andleeb S., Bull J.J., Levin B.R. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS ONE 2017; 12 (1): e0168615. doi:10.1371/journal.pone.0168615
 11. Latz S., Krüttgen A., Häfner H., Buhl E. M., Ritter K., Horz H.P. Differential Effect of Newly Isolated Phages Belonging to PB1-Like, phiKZ-Like and LUZ24-Like Viruses against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* under Varying Growth Conditions Viruses 2017; 9 (315). doi:10.3390/v9110315
 12. Chan B. K., Turner P. E., Kim S., Mojibian H. R., Eleftheriades J. A., Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Evolution, Medicine, and Public Health 2018; 1 (2018): 60–66. doi:10.1039/emph/eoy005
 13. Schmidt C. Phage therapy's latest makeover. Nature Biotechnology 2019; <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0133-z>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горшкова Анна Сергеевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН, Иркутск
 Дрюккер Валентин Валерьянович — д. б. н., главный научный сотрудник лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН, Иркутск

Сыкилинда Нина Николаевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории генной инженерии Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Оценка эффективности антибиотиков в отношении *Vibrio cholerae* в условиях формирования сложной биоплёнки

*Н. А. СЕЛЯНСКАЯ, Е. А. МЕНЬШИКОВА, Е. М. КУРБАТОВА, С. Н. ГОЛОВИН

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Evaluation of Antibiotics Effectiveness Against *Vibrio Cholerae* under the Conditions of Complex Biofilm Formation

*N. A. SELANSKAYA, E. A. MENSNIKOVA, E. M. KURBATOVA, S. N. GOLOVIN

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don

Изучена эффективность 9 антибиотиков в отношении моно- и полимикробных биоплёнок, образованных *in vitro* на фрагментах экзоскелета хитинового панциря широкопалого речного рака *Astacus astacus* штаммами *Vibrio cholerae* O1 в монокультуре и в ассоциации с условно-патогенными бактериями *Klebsiella* spp. и *V. cholerae* nonO1/nonO139. Выявлено повышение антибиотикоустойчивости мономикробных биоплёнок в сравнении с планктонной формой. Устойчивость к большинству антибактериальных препаратов в составе полимикробных биоплёнок соответствовала значениям этих препаратов для штамма, наиболее устойчивого в составе мономикробной биоплёнки. В биоплёнках, образованных токсигенными классическими штаммами совместно с *V. cholerae* nonO1/nonO139, наблюдалось увеличение устойчивости к двум и трём препаратам, а совместно с *Klebsiella* spp. — к одному антибактериальному препарату. Изменения антибиотикочувствительности при взаимодействии между бактериями в составе полимикробной биоплёнки должны приниматься во внимание при разработке тактики профилактики и лечения инфекций.

Ключевые слова: холерный вибрион, биоплёнка, антибиотикорезистентность.

The effectiveness of 9 antibiotics against mono- and polymicrobial biofilms formed by *Vibrio cholerae* O1 strains was studied *in vitro* on fragments of chitinous exoskeleton of broad-fingered crayfish *Astacus astacus* in monoculture and together with opportunistic bacteria *Klebsiella* spp. and non-O1/non-O139 *V. cholerae*. An increase in the antibiotic resistance of monomicrobial biofilms compared with planktonic bacteria was observed. Resistance of the polymicrobial biofilm bacteria to most antibacterial drugs corresponded to the resistance of the most stable strain in the monomicrobial biofilm. An increase in resistance to two and three drugs was observed in biofilms formed by classical toxigenic strains together with non-O1/non-O139 *V. cholerae*, while in biofilms formed together with *Klebsiella* spp. — to one antibacterial drug. Changes in antibiotic sensitivity during the interaction between bacteria in polymicrobial biofilm should be taken into account when developing tactics for prevention and treatment of infections.

Keywords: *Vibrio cholerae*, biofilm, antibiotic resistance.

Введение

Представители рода *Vibrio* широко распространены в различных водоёмах мира и являются важным компонентом биоценоза, участвуя в круговороте органических веществ. В настоящее время убедительно представлено значение поверхностных водоёмов как сложной составной части среды обитания *Vibrio cholerae* El Tor [1]. Особую роль в сохранении и эволюционных преобразованиях холерного вибриона в водных экосистемах играют хитинсодержащие планктонные животные, из которых наибольшую часть составляют ракообразные [2, 3]. Хитинсодержащие водные организмы служат для *V. cholerae* местом обитания (резервуаром), питательным субстратом, своеобразным убе-

жищем от неблагоприятных факторов окружающей среды, а для человека — средством его инфицирования при употреблении загрязнённой планктоном воды и необработанных морепродуктов [4].

Вступая в сложные взаимодействия с представителями водной микрофлоры, включая условно-патогенные бактерии, холерные вибрионы способны прикрепляться к различным абиотическим и биотическим поверхностям и образовывать высокоорганизованные биоплёнки [5].

Данные литературы свидетельствуют о том, что в составе биоплёнок бактерии становятся более устойчивыми к воздействию внешних факторов, в том числе антибактериальных препаратов, из-за наличия экзополисахаридного матрикса, создающего диффузионный барьер и содержащего внеклеточные ферменты, разрушающие антибиотики [6]. Кроме того, в биоплёнках присутствует значительное количество клеток в стационарной фазе, имеющих пониженную чувствительность ко

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. Ростовский-на-Дону противочумный институт. E. mail: ppdn@inbox.ru

многим противомикробным препаратам, а также клеток-персистеров, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [7, 8].

Высокая плотность клеток и повышенная генетическая компетентность в бактериальных сообществах способствуют более эффективной передаче (до 700 раз) между бактериями мобильных генетических элементов с генами антибиотикоустойчивости по сравнению со свободноживущими бактериальными клетками [9, 10].

В биоплёнках *V.cholerae* имеется альтернативный механизм горизонтального переноса генов, обеспечиваемый системой секреции VI типа, которая позволяет получать ДНК других бактерий путём их лизиса и захвата с помощью механизмов компетентности и/или естественной трансформации [11].

Исследования учёных показали, что полимикробные биоплёнки в сравнении с мономикробными имеют повышенный уровень синтеза факторов вирулентности и более плотный, непроницаемый для антибактериальных веществ матрикс, состав которого сильно варьирует в зависимости от вида бактерий и условий окружающей среды, и соответственно, может обеспечить более сильную защиту против антимикробных средств [12].

В рамках полимикробной биоплёнки бактерии могут синтезировать различные вещества, помогающие им выжить в агрессивной среде и обеспечивающие условия, способствующие выживанию других членов биоплёнки [13], поэтому чувствительность к антибиотикам одного микроба может измениться в присутствии других видов [14].

Проведённые нами ранее исследования показали повышение антибиотикорезистентности биоплёночных культур холерных вибрионов в сравнении с планктонными формами [15]. Однако данные о чувствительности к антибактериальным препаратам холерных вибрионов в составе смешанной полимикробной биоплёнки на сегодняшний день отсутствуют.

Цель работы — оценить эффективность антибактериальных препаратов в отношении клеток *V.cholerae* в составе полимикробной биоплёнки.

Материал и методы

Для работы из Музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора были получены штаммы: *V.cholerae* O1 classical (ctx⁺ tcp⁺) №№569 В, 1392, *V.cholerae* O1 El Tor (ctx⁺ tcp⁺) №№81, P-5879, *V.cholerae* O1 El Tor (ctx⁻ tcp⁻) №20000, *Klebsiella* spp., *V.cholerae* nonO1/nonO139 №30 (ctx⁻ tcp⁻), которые использовались для получения мономикробных биоплёнок. Для образования полимикробных биоплёнок были сформированы пары штаммов: *V.cholerae* O1 classical 569 В + *Klebsiella* spp., *V.cholerae* O1 El Tor 81 + *Klebsiella* spp., *V.cholerae* O1 El Tor P-5879 + *Klebsiella* spp., *V.cholerae* O1 El Tor 20000 + *Klebsiella* spp., *V.cholerae* O1 classical 569 В + *V.cholerae* nonO1/nonO139 30, *V.cholerae* O1 classical 1392 + *V.cholerae* nonO1/nonO139 30, *V.cholerae* O1 El Tor 81 + *V.cholerae* nonO1/nonO139 30, *V.cholerae* O1 El Tor P-5879 + *V.cholerae* nonO1/nonO139 30.

Моделирование моно- и полимикробных биоплёнок *in vitro* проводили на фрагментах экзоскелета хитинового панциря широкопалого речного рака *Astacus astacus*, которые помещали во флаконы с речной автоклавированной водой (50 мл), контаминированные взвесью 10⁴/мл микробных клеток бактерий и выдерживали при 28±2°С до 20 сут для получения зрелых биоплёнок в соответствии с авторской методикой [16]. Затем пластинки хитина с образовавшимися биоплёнками трёхкратно промывали в физиологическом растворе.

Культуры в мазках-отпечатках биоплёнок идентифицировали по морфологии колоний, тесту на оксидазу и реакции агглютинации на стекле с O1-холерной сывороткой.

Визуализацию матрикса моно- и полимикробных биоплёнок проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Jeol JEM-1011 (ТЭМ). Стандартная процедура пробоподготовки для ТЭМ включает фиксацию фрагментов экзоскелета в 2,5 % растворе глутарового альдегида, постфиксацию и контрастирование 1 % раствором тетраоксида осмия (OsO₄), обезвоживание в растворах этанола восходящей концентрации (50°, 60°, 70°, 80°, абсолютный этанол), пропитывание эпоксидной смолой, заливку и полимеризацию блоков. Из полученных блоков с образцами при помощи ультратома изготавливали ультратонкие срезы толщиной 60–70 нм, которые монтировали на медные сеточки и контрастировали в 1 % водном растворе уранилацетата и в 0,3 % водном растворе цитрата свинца. После высушивания образцы исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

Для определения антибиотикочувствительности биоплёнок пластинки хитина переносили в пенициллиновые флаконы, содержащие двукратные разведения рекомендованных для лечения холеры антибактериальных препаратов в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера, pH 7,7). В контрольные пробы с биоплёнкой антибактериальный препарат не добавляли. Через 24 ч инкубирования в термостате (37°С) делали отпечатки биоплёнок на пластинки с агаром Хоттингера (pH 7,7) и высев по 0,1 мл из планктонной культуры. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09 и МУК 4.2.1890-04, определяя минимальные подавляющие концентрации (МПК) препаратов по наличию или отсутствию роста бактериальных клеток [17, 18].

Результаты исследования

Проведённые ранее исследования свидетельствуют, что токсигенные штаммы *V.cholerae* O1 El Tor при совместном культивировании с нетоксигенными *V.cholerae* O1 El Tor, штаммами *V.cholerae* O1 classical и другими представителями семейства Enterobacteriaceae способны образовывать полимикробные биоплёнки [19, 20]. В нашем исследовании наличие биоплёнок было подтверждено методом трансмиссионной электронной микроскопии.

При сравнительной оценке антибиотикочувствительности установлено, что планктонные культуры *V.cholerae* O1 classical 569 В, *V.cholerae* O1 classical 1392, *V.cholerae* O1 El Tor P-5879, *V.cholerae* nonO1/nonO139 30 обладали чувствительностью ко всем антибактериальным препаратам, взятым в исследование (табл. 1).

Как видно из табл. 1, штаммы *V.cholerae* El Tor 20000 и *Klebsiella* spp. в планктонной форме были устойчивы к триметоприму/сульфаметоксазолу и

Таблица 1. Значения МПК антибактериальных препаратов в отношении планктонных и мономикробных биоплёночных культур

Штамм микроорганизма	Антибактериальный препарат								
	Д	Т	Л	НК	С	А	Р	Ф	Т/С
Значения МПК для планктонных культур, мг/л									
<i>V.cholerae</i> O1 classical 569 B	0,25	0,5	1	1	4	4	1	4	2/10
<i>V.cholerae</i> O1 classical 1392	0,25	0,5	2	1	8	4	1	4	2/10
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879	0,25	0,5	1	1	4	4	1	4	2/10
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81	0,25	0,5	4	64	64	4	4	32	16/80
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 20000	0,5	0,5	4	1	4	4	2	16	16/80
<i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	0,5	1	4	4	8	4	2	8	4/20
<i>Klebsiella</i> spp.	0,5	0,5	2	2	8	4	2	16	16/80
Значения МПК для биоплёночных культур, мг/л									
<i>V.cholerae</i> O1 classical 569 B	32	16	32	512	32	32	16	64	1024/5120
<i>V.cholerae</i> O1 classical 1392	32	64	32	256	32	16	16	64	128/640
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879	64	16	256	512	128	128	64	512	1024/5120
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81	32	16	128	1024	256	128	128	512	1024/5120
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 20000	16	32	128	512	32	16	128	64	1024/5120
<i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	8	32	32	64	32	16	16	64	1024/5120
<i>Klebsiella</i> spp.	32	16	256	1024	256	256	128	64	1024/5120

Примечание. Здесь и в табл. 2: Д – доксициклин; Т – тетрациклин; Л – левомицетин; НК – налидиксовая кислота; С – стрептомицин; А – ампициллин; Р – рифампицин; Ф – фуразолидон; Т/С – триметоприм/сульфаметоксазол.

Таблица 2. Значения МПК антибактериальных препаратов в отношении полимикробных биоплёночных культур

Штамм микроорганизма	Антибактериальный препарат								
	Д	Т	Л	НК	С	А	Р	Ф	Т/С
<i>V.cholerae</i> O1 classical 569 B + <i>Klebsiella</i> spp.	32	64	32	512	32	32	128	64	1024/5120
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81 + <i>Klebsiella</i> spp.	32	16	256	1024	256	256	128	1024	1024/ 5120
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879 + <i>Klebsiella</i> spp.	64	32	256	512	256	256	128	512	1024/ 5120
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 20000 + <i>Klebsiella</i> spp.	32	32	128	512	64	256	128	64	1024/ 5120
<i>V.cholerae</i> O1 classical 569 B + <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	64	256	256	32	128	128	64	1024/ 5120
<i>V.cholerae</i> O1 classical 1392 + <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	8	16	512	32	256	128	64	1024/ 5120
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81 + <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	32	256	1024	256	256	128	64	1024/ 5120
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879 + <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	32	256	512	32	16	16	64	1024/ 5120

фуразолидону, а *V.cholerae* O1 El Tor 81 ещё и к налидиксовой кислоте и стрептомицину.

В отношении мономикробных биоплёнок всех штаммов наблюдалось повышение МПК всех антибактериальных препаратов до значений, соответствующих устойчивым либо промежуточноустойчивым.

Следующим этапом было исследование действия различных антибактериальных препаратов на полимикробные биоплёнки.

Определение антибиотикочувствительности показало, что в большинстве случаев значения МПК антибактериальных препаратов полимикробных биоплёнок соответствовали значениям для биоплёночной формы более устойчивого микроорганизма, находящегося в составе монобиоплёнки (табл. 2).

По данным литературы, в полимикробных биоплёнках бактерии, более устойчивые к антибиотикам, защищают популяцию восприимчивых бактерий [21]. Однако в нашем исследовании в сообществе *V.cholerae* O1 classical 569 B + *Klebsiella* spp. увеличилась устойчивость культур к тетрациклину в 4–8 раз, а МПК левомицетина, ампициллина и стрептомицина оказалась на уровне более низких значений, характерных для

мономикробной биоплёнки, образованной штаммом *V.cholerae* O1 classical 569 B. Аналогично, для биоплёнки, образованной штаммами *V.cholerae* O1 El Tor P-5879 и *V.cholerae* nonO1/nonO139 30, значения МПК стрептомицина, ампициллина, рифампицина и фуразолидона также соответствовали более низким значениям этих антибактериальных препаратов для культур *V.cholerae* nonO1/nonO139 30 в составе мономикробного сообщества. Возможно, это связано с наличием между бактериями наряду с синергетическими, и антагонистическими взаимодействиями [22, 23]. В пределах смешанных биоплёнок лекарственная устойчивость зависит от способности сообщества к сотрудничеству таким образом, что оно может выжить после воздействия противомикробного вещества [24].

При формировании биоплёнки токсигенным классическим штаммом *V.cholerae* O1 classical 1392 совместно с *V.cholerae* nonO1/nonO139 30 в 8–32 раза, в сравнении со значениями для мономикробных биоплёнок этих культур, возросла устойчивость к ампициллину и рифампицину, а в биоплёнке *V.cholerae* O1 classical 569 B + *V.cholerae* nonO1/nonO139 30 — ещё и к левомицетину.

Заключение

Таким образом, в нашем исследовании эффективность антибактериальных препаратов в составе полимикробных сообществ различалась и зависела от вида бактерий, образующих биоплёнку. Устойчивость к большинству антибактериальных препаратов в составе смешанной биоплёнки соответствовала значениям этих препаратов для наиболее устойчивого в составе мономикробной биоплёнки штамма. В смешанных биоплёнках, образованных токсигенными классическими штаммами совместно с *V. cholerae* nonO1/nonO139 наблюдалось увеличение ус-

тойчивости к двум и трём препаратам, а совместно с *Klebsiella* spp. — к одному антибактериальному препарату.

Изменения антибиотикочувствительности при взаимодействии между бактериями в составе смешанной биоплёнки должны приниматься во внимание при разработке тактики профилактики и лечения инфекций. Дальнейшие более глубокие исследования чувствительности к антибактериальным препаратам бактерий в составе полимикробных биоплёнок позволят выявить закономерности, причины изменения антибиотикорезистентности и определить эффективные способы борьбы с биоплёнками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титова С. В., Меньшикова Е. А., Курбатова Е. М. Некоторые аспекты экологии холерных вибрионов. Вода: химия и экология. — 2018. — № 10–12. — С. 91–98. / Titova S. V., Men'shikova E. A., Kurbatova E. M. Nekotorye aspekty ekologii kholernykh vibriionov. Voda: Khimiya i Ekologiya 2018; 10–12: 91–98. [in Russian]
2. Андрусенко И. Т., Ломов Ю. М., Телесманич Н. Р., Акулова М. В., Москвитина Э. А. Гидробионтный фактор в эпидемиологии холеры. ЗНИСО. — 2009. — № 3. — С. 11–19. / Andrusenko I. T., Lomov Yu. M., Telesmanich N. R., Akulova M. V., Moskvitina E. A. Gidrobiontny Faktor v Epidemiologii Kholery ZNISO 2009; 3: 11–19. [in Russian]
3. Марков Е. Ю., Куликалова Е. С., Урбанович Л. Я., Вишняков В. С., Балахонов С. В. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae*. Биохимия. — 2015. — Т. 80. — № 9. — С. 1334–1343. / Markov E. Yu., Kulikalova E. S., Urbanovich L. Ya., Vishnyakov V. S., Balakhonov S. V. Khitin i produkty ego gidroliza v ekologii *Vibrio cholerae*. Biokhimiya 2015; 80: 9: 1334–1343. [in Russian]
4. Куликалова Е. С., Урбанович Л. Я., Марков Е. Ю., Вишняков В. С., Миронова Л. В., Балахонов С. В., Шкаруба Т. Т. Связь холерного вибриона с водными организмами и её значение в эпидемиологии холеры. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2014. — № 4. — С. 19–25. / Kulikalova E. S., Urbanovich L. Ya., Markov E. Yu., Vishnyakov V. S., Mironova L. V., Balakhonov S. V., Shkaruba T. T. Svyaz kholernogo vibriona s vodnymi organizmami i ee znachenie v epidemiologii kholery. Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika 2014; 4: 19–25. [in Russian]
5. Sun S., Tay Q. X., Kjelleberg S., Rice S. A., McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilm. SME J 2015 Aug; 9 (8): 1812–1820.
6. Madsen J. S., Burmølle M., Hansen H. L., Sørensen S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 65: 183–195.
7. Amato S. M., Fazen C. H., Henry T. C., Mok W. W., Orman M. A., Sandvik E. L., Brynildsen M. P. The role of metabolism in bacterial persistence. Frontiers in Microbiology 2014; 5: 70.
8. Conlon B. P., Rowe S. E., Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections. Adv Exp Med Biol 2015; 831: 1–9.
9. Król J. E., Wojtowicz A. J., Rogers L. M., Heuer H., Smalla K., Krone S. M., Top E. M. Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. Plasmid 2013; 70 (1): 110–119.
10. Hoibya N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents 2010; 35: 322–332.
11. Borgeaud S., Metzger L. C., Scrinari T., Blokesch M. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. Science 2015; 347: 63–67.
12. Flemming H. C., Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 2010; 8 (9): 623–33.
13. Bradshaw D. J., Marsh P. D., Watson G. K., Allison C. Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. Lett Appl Microbiol 1997; 25: 385–387.
14. Burmølle M., Webb J. S., Rao D., Hansen L. H., Sørensen S. J., Kjelleberg S. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. Appl Environ Microbiol 2006; 72 (6): 3916–3923. [in Russian]
15. Селянская Н. А., Титова С. В., Головин С. А., Егизарян Л. А., Веркина Л. М., Тришина А. В. Действие антибактериальных препаратов на биоплёнки холерных вибрионов ЭльТор. ЖМЭИ. — 2017. — № 2. — С. 8–15. / Selyanskaya N. A., Titova S. V., Golovin S. A., Egizaryan L. A., Verkina L. M., Trishina A. V. Deystvie antibakterial'nykh preparatov na bioplenki kholernykh vibriionov El'Tor. ZhMEI 2017; 2: 8–15. [in Russian]
16. Способ моделирования биоплёнок, формируемых *V. cholerae* O1 серогрупп на поверхности хитина: Патент РФ 2018103604 от 6.03.2019. / Sposob modelirovaniya bioplenok, formiruemyykh V.cholerae O1 serograpp na poverkhnosti khitina: Patent RF 2018103604 от 6.03.2019. [in Russian]
17. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллёз, сепсис, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.2495–09. М.: 2009. / Opredelenie chuvstvitel'nosti vzbuditeley opasnykh bakterial'nykh infektsiy (chuma, sibirskaya yazva, kholera, tulyaremiya, brutsellez, sap, melioidoz) k antibakterial'nym preparatam: Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2495–09. M.: 2009. [in Russian]
18. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890–04. М.: 2004. — 91 с. / Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890–04. M.: 2004; 91. [in Russian]
19. Водопьянов С. О., Титова С. В., Водопьянов А. С., Веркина Л. М., Олейников И. П., Писанов Р. В., Лысова Л. К., Селянская Н. А., Рыковская О. А. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биоплёнках. ЗНИСО. — 2017. — № 3 (288). — С. 51–54. / Vodop'yanov S. O., Titova S. V., Vodop'yanov A. S., Verkina L. M., Olejnikov I. P., Pisanov R. V., Lysova L. K., Selyanskaya N. A., Rykovskaya O. A. Izuchenie mezvidovoy konkurentsii *Vibrio cholerae* v bioplenkakh. ZNISO 2017; 3 (288): 51–54. [in Russian]
20. Водопьянов С. О., Веркина Л. М., Водопьянов А. С., Олейников И. П., Егизарян Л. А., Титова С. В. Анализ внутривидовой конкуренции в биоплёнке *Vibrio cholerae* классического и эльтор биоваров с помощью Indel-маркеров. Молекулярная диагностика. — 2017. — Т. 1. — С. 300–301. / Vodop'yanov S. O., Verkina L. M., Vodop'yanov A. S., Olejnikov I. P., Egizaryan L. A., Titova S. V. Analiz vnutrividovoy konkurentsii v bioplenke *Vibrio cholerae* klassicheskogo i el'tor biovarov s pomoshch'yu Indel-markerov. Molekulyarnaya Diagnostika 2017; 1: 300–301. [in Russian]
21. Плакунов В. К., Николаев Ю. А., Ганнесен А. В., Чемаева Д. С., Журнина М. В. Новый подход к выявлению защитной роли *Escherichia coli* в отношении грамположительных бактерий при действии антибиотиков на бинарные биоплёнки. Микробиология. — 2019. — Т. 88. — № 3. — С. 288–296. / Plakunov V. K., Nikolaev Yu. A., Gannesen A. V., Chemaeva D. S., Zhurina M. V. Novyy podkhod k vyavleniyu zashchitnoy roli *Escherichia coli* v otnoshenii grampolozhitel'nykh bakteriy pri deystvii antibiotikov na binarnye bioplenki. Mikrobiologiya 2019; 88: 3: 288–296. [in Russian]
22. Periasamy S., Kolenbrander P. E. Aggregatibacter actinomycetemcomitans builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. Infect Immun 2009; 77 (9): 3542–3551.
23. Elias S., Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiol Rev 2012; 36 (5): 990–1004.
24. Kara D., Luppens S. B., Cate J. M. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. Eur J Oral Sci 2006; 114: 58–63.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Селянская Надежда Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментально-биологических моделей ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону

Меньшикова Елена Аркадьевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории экологии холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону

Курбатова Екатерина Михайловна — научный сотрудник лаборатории экологии холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону.

Головин Сергей Николаевич — младший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону

Эффективность антифунгальных препаратов в отношении грибов рода *Candida*, выделенных в Московском регионе

*И. Г. АХАПКИНА¹, А. М. ГЛУШАКОВА^{1,2}, Е. Н. РОДИОНОВА¹, А. В. КАЧАЛКИН^{2,3}

¹ ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва

² ФГБОУВО Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино

The Effectiveness of Antifungal Agents Against Yeasts of *Candida* Genus Isolated in Moscow Region

*I. G. AKHAPKINA¹, A. M. GLUSHAKOVA^{1,2}, E. N. RODIONOVA¹, A. V. KACHALKIN^{2,3}

¹ I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

² Lomonosov Moscow State University, Moscow

³ G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the RAS, Pushchino, Moscow region

К современным проблемам лечения кандидозов относятся изменение чувствительности грибов к используемым, часто с целью профилактики, антифунгальным препаратам, и изменение спектра ведущих этиологических агентов. **Цель.** Анализ изменения эффективности антимикотиков в отношении грибов рода *Candida*, выделенных из клинических и природных материалов в течение 2014–2019 гг. в Москве. **Материал и методы.** Антибиотикочувствительность 186 изолятов (75 клинических, 128 природных) видов: *Candida albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C.intermedia*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C.guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) определяли диско-диффузным методом. **Результаты.** Частота встречаемости среди клинических изолятов, выделенных в 2014 г.: *C.albicans* (23,53%), *C.tropicalis* (20,59%), *C.guilliermondii* (20,58%), *C.parapsilosis* (17,65%), *C.glabrata* (17,65%); в 2019 г. — *C.parapsilosis* (21,95%), *C.albicans* (17,07%), *C.tropicalis* (12,19%), *C.guilliermondii* (12,19%), *C.krusei* (9,76%), *C.glabrata* (9,76%), *C.lusitaniae* (9,76%), *C.intermedia* (7,32%); среди природных изолятов, выделенных в 2014 г.: *C.parapsilosis* (29,17%), *C.guilliermondii* (25,0%), *C.glabrata* (16,67%), *C.albicans* (16,67%), *C.tropicalis* (12,5%); в 2016–2018 гг.: *C.lusitaniae* (14,94%), *C.tropicalis* (14,94%), *C.glabrata* (13,79%), *C.intermedia* (13,79%), *C.parapsilosis* (11,5%), *C.guilliermondii* (11,5%), *C.krusei* (10,34%), *C.albicans* (9,2%). Продемонстрировали чувствительность в 2014 г. и 2019 г. к флуконазолу 70,59 и 17,07%, к клотримазолу — 100 и 80,49%, к интраконазолу — 94,12 и 58,54%, к нистатину — 97,06 и 73,17%, к амфотерицину В — 100 и 75,61% клинических изолятов. 70,83% природных изолятов, выделенных в 2014 г., были чувствительны ко всем антимикотикам. Чувствительными к флуконазолу были 26,44%, к клотримазолу — 66,67%, к интраконазолу — 43,68%, к нистатину — 48,28%, к амфотерицину В — 63,22% природных изолятов, выделенных в 2016–2018 гг. **Заключение.** В течение пяти лет наблюдения чувствительность клинических изолятов рода *Candida* к рассмотренным антимикотикам снизилась на 19,51–53,52%, природных изолятов — на 4,16–44,39%. Возможно, что на распространение резистентности среди этих дрожжевых грибов влияют коэволюционные процессы, протекающие внутри сообщества микроорганизмов, под воздействием антропогенных факторов.

Ключевые слова: дрожжевые грибы, *Candida*, кандидоз, резистентность, оппортунистические инфекции.

Background. Current problems in the treatment of candidiasis include changes in the sensitivity of yeasts to antifungal agents, often used for the purpose of prevention, and changes in the spectrum of leading etiological agents. **Aim.** Analysis of changes in the antimicrobial effectiveness against *Candida* isolated from clinical and natural materials during 2014–2019 in Moscow. **Materials and methods.** Antibiotic sensitivity of 186 isolates (75 clinical, 128 natural) of *Candida* species: *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C.intermedia*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C.guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), was determined by disc-diffusion method. **Results.** The incidence among clinical isolates isolated in 2014: *C.albicans* (23.53%), *C.tropicalis* (20.59%), *C.guilliermondii* (20.58%), *C.parapsilosis* (17.65%), *C.glabrata* (17.65%); in 2019: *C.parapsilosis* (21.95%), *C.albicans* (17.07%), *C.tropicalis* (12.19%), *C.guilliermondii* (12.19%), *C.krusei* (9.76%), *C.glabrata* (9.76%), *C.lusitaniae* (9.76%), *C.intermedia* (7.32%). Incidence among natural isolates isolated in 2014: *C.parapsilosis* (29.17%), *C.guilliermondii* (25.0%), *C.glabrata* (16.67%), *C.albicans* (16.67%), *C.tropicalis* (12.5%); in 2016–2018: *C.lusitaniae* (14.94%), *C.tropicalis* (14.94%), *C.glabrata* (13.79%), *C.intermedia* (13.79%), *C.parapsilosis* (11.5%), *C.guilliermondii* (11.5%), *C.krusei* (10.34%), *C.albicans* (9.2%). 70.59% and 17.07% of clinical isolates demonstrated sensitivity to fluconazole in 2014 and 2019, respectively; 100% and 80.49% — to clotrimazole, 94.12% and 58.54% — to intraconazole, 97.06% and 73.17% — to nystatin, 100% and 75.61% — to amphotericin B. 70.83% of natural isolates isolated in 2014 were sensitive to all antimicrobial agents. 26.44% were sensitive to fluconazole, 66.67% to clotrimazole, 43.68% to intraconazole, 48.28% to nystatin, 63.22% of the natural isolates isolated in 2016–2018 to amphotericin B. **Conclusion.** During five years of observation, the antimicrobial sensitivity decreased by 19.51–53.52% for clinical isolates of *Candida* genus and by 4.16–44.39% for natural isolates. It is possible that the spread of resistance among these yeasts is influenced by co-evolutionary processes occurring within the community of microorganisms under the influence of anthropogenic factors.

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 105064 Москва Малый Казенный пер. д. 5А. НИИВС им. И. И. Мечникова.

Keywords: yeasts, *Candida*, candidiasis, resistance, opportunistic infections.

Введение

В современной медицинской практике широкое распространение новых технологий оказания помощи стало одной из причин увеличения случаев развития микозов, особенно среди иммунокомпрометированных людей [1–3]. Полагают, что микозы развиваются вследствие таких клинических состояний, как хронические инфекции, интоксикация, гормональная или обменная патология, нерациональное использование антибиотиков и антисептиков, кортикостероидов, цитостатиков, травмирование тканей организма, лучевая терапия [4]. В настоящее время также отмечается изменение спектра ведущих инфекционных агентов кандидозов. Ранее большинство кандидозов было вызвано инфицированием организма человека видом *Candida albicans* [1, 2]. В последнее время чаще стали выделять из клинического материала такие виды, как *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.lusitania* [5, 6]. Кандидозы, обусловленные разными видами кандид, различаются характером течения заболевания и его последствиями. Например, инфицирование *C.glabrata* отличается более высоким количеством летальных исходов по сравнению с более распространённым инфицированием *C.parapsilosis* [7]. Несмотря на расширение спектра антимикотиков современной проблемой лечения кандидозов является изменение чувствительности дрожжевых грибов к широко применяемым, часто с целью профилактики, антифунгальным препаратам, требующее либо назначения другого антимикотика, либо увеличения концентрации препарата. Последнее приводит к увеличению токсической нагрузки на макроорганизм, следовательно, не всегда возможно. Более того, люди постоянно контактируют с грибами, развивающимися в различных природных субстратах, таких как почва, продукты питания, сочные плоды, пыльца деревьев. Вполне вероятно, что именно эти контакты постепенно приводят к увеличивающейся колонизационной активности в отношении человека видов кандид, ранее не выявлявшихся в качестве этиологических агентов кандидозов. Поэтому во многих лабораториях не прекращаются поиски и разработки новых антимикотических препаратов. Например, проводятся исследования по созданию лечебных вакцинных препаратов, в основе которых лежат антитела против бета-глюканов и манно-протеинов грибов [8, 9]. Большой интерес представляет сообщение о противокандидозной активности пептида, выделенного из человеческого хромогранина А [10]. Однако, несмотря на интенсивные поиски новых антимикотиков, уже известные антифунгальные препараты не теряют своей актуальности. В связи с вышесказанным целью работы был анализ изменения эффективности азольных и полиеновых антифунгальных

препаратов в отношении дрожжевых грибов рода *Candida*, выделенных из клинических и природных материалов в течение 2014–2019 гг. в московском мегаполисе.

Материал и методы

В работе использовали 186 штаммов дрожжевых грибов следующих видов: *Candida albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C.intermedia*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C.guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*). 75 штаммов выделены из клинического материала иммунокомпрометированных людей — пациентов аллергологического центра ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва» и ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» МЗ РФ (34 — в 2014 г., 41 — в 2019 г.). 128 штаммов выделены из образцов почв внутригородских зон размещения бытовых отходов, придорожных зон городских автомагистралей, лугов разнотравных (Национальный парк «Лосиный остров»), смешанных лесов (Природно-исторический парк «Измайлово»), пылицы ветроопыляемых растений, мякоти яблок и слив в г. Москве (24 — в 2014 г., 87 — в 2016–2018 гг.). Антибиотикочувствительность грибов определяли диско-диффузным методом при помощи расширенного набора дисков с противогрибными препаратами, согласно прилагаемой инструкции (НИЦФ, Россия; НИИ ЭИМ им. Пастера, Россия). Агаризованная глюкозо-пептонная среда лабораторного приготовления (агар — 20 г/л, пептон — 5 г/л, дрожжевой экстракт — 2,5 г/л, глюкоза — 10 г/л). Готовили разведение каждого штамма, соответствующего по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащего примерно $1,4 \times 10^8$ КОЕ/мл. 1 мл разведения наносили на поверхность плотной среды в чашках Петри и тщательно растирали шпателем до тех пор, пока поверхность не становилась полностью сухой. Через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды помещали диски с антибиотиками (амфотерицин В — 40 мкг; нистатин — 80 мкг; клотримазол — 10 мкг; флуконазол — 40 мкг; интраконазол — 10 мкг). Чашки со всеми исследуемыми штаммами параллельно инкубировали при $t = 25^\circ\text{C}$ и при $t = 37^\circ\text{C}$ в течение 72 и 24 ч, соответственно. Учёт результатов проводили в отражённом свете при помощи штангенциркуля. Диаметр зон подавления роста измерялся с точностью до 1 мм. Все штаммы исследовали для каждого антибиотика в трёх повторностях.

Результаты исследования

В 2014 г. из клинического материала выделили следующие виды дрожжевых грибов рода *Candida*: *C.albicans* ($n=8$), *C.parapsilosis* ($n=6$), *C.glabrata* ($n=6$), *C.tropicalis* ($n=7$), *C.guilliermondii* ($n=7$); из природного материала — *C.albicans* ($n=4$), *C.parapsilosis* ($n=7$), *C.glabrata* ($n=4$), *C.tropicalis* ($n=3$), *C.guilliermondii* ($n=6$). В течение 2016–2018 гг. увеличилось количество видов, выделенных как из клинического материала, так и из природного. Среди клинических изолятов были: *C.albicans* ($n=7$), *C.parapsilosis* ($n=9$), *C.glabrata* ($n=4$), *C.tropicalis* ($n=5$), *C.guilliermondii* ($n=5$), *C.krusei* ($n=4$), *C.lusitaniae* ($n=4$), *C.intermedia* ($n=3$). Среди природных изолятов были следующие виды: *C.albicans* ($n=15$), *C.parapsilosis* ($n=19$), *C.glabrata* ($n=16$), *C.tropicalis* ($n=18$), *C.guilliermondii* ($n=15$), *C.krusei* ($n=13$), *C.lusitaniae* ($n=17$), *C.intermedia* ($n=15$). Профиль противогрибной активности антимикотиков рассматривали с позиций проявления фунгицидного и фунгистати-

Таблица 1. Относительное количество штаммов разных видов дрожжевых грибов, по отношению к которым антифунгальные препараты проявляют фунгицидное (ФЦ) и фунгистатическое (ФС) действия

Вид	Характер изолятов	Год выделения	Характер действия антимикотика	Относительное количество штаммов дрожжевых грибов, в отношении которых определено действие антимикотиков, %				
				флуко- назол	клотри- мазол	интрако- назол	нистатин	амфоте- рицин В
<i>C.albicans</i>	Клинический	2014	ФЦ	100	100	100	100	100
			ФС	0	0	0	0	0
		2019	ФЦ	0	71,43	42,96	57,17	71,43
			ФС	28,57	0	28,57	0	0
	Природный	2014	ФЦ	100	100	100	100	100
			ФС	0	0	0	0	0
		2016–2018	ФЦ	0	87,5	37,5	62,5	75,0
			ФС	50	0	25,0	0	0
<i>C.parapsilosis</i>	Клинический	2014	ФЦ	100	100	100	100	100
			ФС	0	0	0	0	0
		2019	ФЦ	0	88,89	88,89	88,89	88,89
			ФС	88,89	0	0	0	0
	Природный	2014	ФЦ	0	0	0	0	0
			ФС	0	0	0	0	0
		2016–2018	ФЦ	0	50,0	30,0	30,0	50,0
			ФС	30,0	0	20,0	0	0
<i>C.tropicalis</i>	Клинический	2014	ФЦ	100	100	85,71	85,71	100
			ФС	0	14,29	0	0	0
		2019	ФЦ	0	60,0	40,0	60,0	60,0
			ФС	30,77	0	20,0	0	0
	Природный	2014	ФЦ	100	100	100	100	100
			ФС	0	0	0	0	0
		2016–2018	ФЦ	30,77	84,62	61,54	61,54	84,62
			ФС	30,77	0	23,08	0	0
<i>C.guilliermondii</i>	Клинический	2014	ФЦ	57,14	100	100	100	100
			ФС	42,86	0	0	0	0
		2019	ФЦ	0	100	80,0	100	100
			ФС	80,0	0	20,0	0	0
	Природный	2014	ФЦ	100	100	100	100	100
			ФС	0	0	0	0	0
		2016–2018	ФЦ	31,25	100	36,36	54,54	90,0
			ФС	31,25	0	36,36	0	0
<i>C.glabrata</i>	Клинический	2014	ФЦ	83,33	100	100	100	100
			ФС	0	0	16,67	0	0
		2019	ФЦ	0	100	50,0	100	75,0
			ФС	50,0	0	50,0	0	0
	Природный	2014	ФЦ	100	100	100	100	100
			ФС	0	0	0	0	0
		2016–2018	ФЦ	0	27,27	16,67	25,0	33,33
			ФС	25,0	0	16,67	0	0
<i>C.intermedia</i>	Клинический	2019	ФЦ	66,67	100	100	100	100
			ФС	33,33	0	0	0	0
	Природный	2016–2018	ФЦ	16,67	66,67	58,33	58,33	75,0
			ФС	41,67	0	16,67	0	0
<i>C.krusei</i>	Клинический	2019	ФЦ	0	100	50,0	50,0	75,0
			ФС	33,33	0	25,0	0	0
	Природный	2016–2018	ФЦ	0	22,22	0	11,11	11,11
			ФС	0	0	11,11	0	0
<i>C.lusitania</i>	Клинический	2019	ФЦ	0	25,0	0	0	25,0
			ФС	0	0	50,0	0	0
	Природный	2016–2018	ФЦ	15,38	84,62	53,85	53,85	76,92
			ФС	46,15	0	23,08	0	0

ческого действий относительно отдельных видов кандид и общего количества клинических и природных изолятов. Результаты представлены в табл. 1, 2. Разница между количеством штаммов грибов, выделенных из клинического и природного материалов в 2014 г. и чувствительных к флуконазолу, клотримазолу, интраконазолу, нистатину, амфотерицину В, составляет 0,24,

29,17, 23,29, 26,23, 29,17%, соответственно; в 2016–2019 гг. — 9,37, 13,82, 14,86, 24,89, 12,39%, соответственно.

Обсуждение

Более 90% инвазивных кандидозов в мире вызвано 5 наиболее распространёнными видами дрожжевых грибов: *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropi-*

Таблица 2. Эффективность антифунгальных препаратов в отношении дрожжевых грибов рода *Candida*

Действие антимикотиков	Относительное количество штаммов грибов рода <i>Candida</i> (%)					
	2014 г.			2019 г.	2016–2018 гг.	2016–2019 гг.
	клинические	природные	всего	клинические	природные	всего
Флуконазол						
+	70,59	70,83	70,69	17,07	26,44	23,44
±	26,47	0	15,52	41,46	19,54	26,5
—	2,94	29,17	13,79	41,46	54,02	50,0
Клотримазол						
+	100	70,83	87,93	80,49	66,67	71,09
±	0	0	0	0	0	0
—	0	29,17	12,07	19,51	33,33	28,91
Итраконазол						
+	94,12	70,83	84,48	58,54	43,68	48,44
±	5,88	0	3,45	21,95	19,54	20,31
—	0	29,17	12,07	19,51	36,78	31,25
Нистатин						
+	97,06	70,83	86,21	73,17	48,28	56,25
±	0	0	0	0	0	0
—	2,94	29,17	13,79	26,83	51,72	43,75
Амфотерицин В						
+	100	70,83	87,93	75,61	63,22	67,19
±	0	0	0	0	0	0
—	0	29,17	12,07	24,39	36,78	32,81

Примечание. «+» — фунгицидное действие; «±» — фунгистатическое действие; «—» — не оказывает действия на рост грибов.

calis, *C.parapsilosis*, *C.krusei*. [11]. Отмечаются географические и временные различия в частоте выявления отдельных видов грибов. Например, в странах азиатско-тихоокеанского региона, Латинской и Северной Америки, Европы в 2004–2006 гг. среди клинических изолятов *C.albicans* выявляли в 44–64% случаев кандидозов, штаммы *C.parapsilosis* занимали второе место по частоте выделения (9,0–19,7%). *C.glabrata* в странах Северной Америки выявлялся чаще, чем в странах Южной Америки, Европы и Азиатско-Тихоокеанского региона (21,8–27,4% и 4,2–11,8%, соответственно). В тоже время *C.tropicalis* чаще определялся в качестве клинического изолята в странах Южной Америки, Европы и Азиатско-Тихоокеанского региона (16,4–7,6%) по сравнению с показателями стран Северной Америки (2,6–7,8%) [12].

Широкомасштабное исследование, проведённое в Израиле в 2005–2007 гг., показало, что частота выявления разных видов дрожжевых грибов в клиническом материале убывала в следующем ряду: *C.albicans* (44,5%), *C.parapsilosis* (16,8%), *C.tropicalis* (16,6%), *C.glabrata* (15,3%), *C.krusei* (3,1%), *C.guilliermondii* (0,4%), *C.farinosa* (0,2%) [13]. Объединённые исследования, проведённые в Латинской Америке в 2008–2010 гг. по изучению этиологических агентов кандидемий, привели к следующим средним показателям частоты выявления: *C.albicans* (37,6%), *C.parapsilosis* (26,5%), *C.tropicalis* (17,6%), *C.guilliermondii* (6,5%), *C.glabrata* (6,3%), *C.krusei* (2,7%), отмечены единичные случаи выявления *C.lusitaniae* в странах региона [14]. В Индии в 2011–2012 гг. от-

мечено резкое увеличение кандидемий, вызванных *C.tropicalis* (41,6%) [15].

В Турции (2011–2012 гг.) видовое распределение изолятов было следующим: *C.parapsilosis* (22,14%), *C.tropicalis* (18,57%), *C.glabrata* (15%), *C.albicans* (12,86%), *C.lusitaniae* (11,43%), *C.krusei* (11,43%), *C.kefyr* (6,43%), *C.guilliermondii* (1,43%), *C.dubliniensis* (0,71%) [16]. В Австралии в 2014–2015 гг. изоляты кандиды распределились следующим образом: *C.albicans* (44,4%), *C.glabrata* (26,7%), *C.parapsilosis* (16,5%), *C.tropicalis* (4,8%), *C.lipolytica* (2,8%), *C.krusei* (2,6%), *C.lusitaniae* (2%), *C.dubliniensis* (1,6%), *C.guilliermondii* (0,2%). Авторы отметили увеличение случаев инфицирования *C.glabrata* [17].

Исследования, проведённые в Китае в 2009–2014 гг., показали следующее распределение видов кандид по частоте встречаемости: *C.albicans* (44,9%), *C.parapsilosis* (20,0%), *C.tropicalis* (17,2%), *C.glabrata* (10,8%), *C.guilliermondii* (2,1%), *C.krusei* (1,44%) [18]. В Московском регионе частота встречаемости видов дрожжевых грибов среди клинических изолятов, выделенных в 2014 г. убывает в следующем ряду: *C.albicans* (23,53%), *C.tropicalis* (20,59%), *C.guilliermondii* (20,58%), *C.parapsilosis* (17,65%), *C.glabrata* (17,65%). При этом *C.albicans*, вероятно, нельзя назвать доминирующим инфекционным агентом, поскольку другие виды по встречаемости отличается всего на 3–6%. Однако интересно отметить, что в нашем случае, *C.tropicalis* встречается несколько чаще, чем в других регионах мира, за исключением Австралии. *C.guilliermondii* в Московском регионе входит в три основных ведущих

этиологических агентов кандидозов, в отличие от данных, приведенных в источниках литературы, в которых этот вид встречается в пределах 0,2–6,5% [14, 16, 17]. *C.glabrata* — вид, способный вызвать кандидемию с самыми тяжёлыми последствиями, выявляется примерно с той же частотой, что и в Турции и Израиле [13, 16].

Эпидемическая картина в 2019 г. меняется в связи с выделением новых для Москвы видов дрожжей рода *Candida* и изменением соотношения между видами грибов (удельного обилия). Частота встречаемости видов кандид среди клинических изолятов уменьшается в следующем порядке: *C.parapsilosis* (21,95%), *C.albicans* (17,07%), *C.tropicalis* (12,19%), *C.guilliermondii* (12,19%), *C.krusei* (9,76%), *C.glabrata* (9,76%), *C.lusitaniae* (9,76%), *C.intermedia* (7,32%). На наш взгляд появление новых видов среди инфекционных агентов кандидозов может быть связано с коэволюционными процессами, протекающими в сообществе дрожжевых грибов в окружающей среде под влиянием антропогенных факторов, приводящими к демонстрации отдельными видами или штаммами одного вида патогенных свойств в отношении человека. Поэтому, параллельно изучению клинических изолятов, мы провели выделение и определение антибиотикочувствительности дрожжевых грибов рода *Candida* из окружающей среды. Частота встречаемости видов дрожжевых грибов среди природных изолятов, выделенных в 2014 г. убывает в следующем ряду: *C.parapsilosis* (29,17%), *C.guilliermondii* (25,0%), *C.glabrata* (16,67%), *C.albicans* (16,67%), *C.tropicalis* (12,5%); выделенных в 2016–2018 гг.: *C.lusitaniae* (14,94%), *C.tropicalis* (14,94%), *C.glabrata* (13,79%), *C.intermedia* (13,79%), *C.parapsilosis* (11,5%), *C.guilliermondii* (11,5%), *C.krusei* (10,34%), *C.albicans* (9,2%).

Как видно из приведённых данных прямой корреляции между частотой встречаемости видов кандид среди клинических изолятов, выделенных в 2019 г. и частотой встречаемости этих же микроорганизмов среди природных изолятов, выделенных в 2014 г. и 2016–2018 гг. нет. Однако заслуживает внимание, что *C.parapsilosis* в 2014 г. являлся доминирующим видом среди природных изолятов, а в 2019 г. занял такую же позицию среди клинических изолятов. *C.guilliermondii* сместился на третье место, уступив при этом только широко распространённому *C.albicans*. Безусловно, при обсуждении эпидемиологической ситуации следует учитывать не только распространённость отдельных видов грибов среди клинических и природных изолятов, но и физиолого-биохимические свойства отдельных видов, а также внутривидовые отличия, в частности, вирулентность и резистентность штаммов одного и того же вида.

В нашем исследовании мы отметили внутривидовое снижение чувствительности к антимико-

тикам с течением времени как среди клинических, так и среди природных изолятов (см. табл. 1). Исключением являются природные изоляты *C.parapsilosis*, среди которых в 2019 г. количество резистентных штаммов снизилось до 50–70%. Ранее мы предположили, что доминирующее положение *C.parapsilosis* в 2019 г. среди клинических изолятов обусловлено частотой встречаемости в природном материале в предшествующие годы, но, возможно, вторым фактором является распространённость резистентности среди природных изолятов этого вида. Привлекают внимание штаммы *C.lusitaniae*, только четверть которых оказалась чувствительной к клотримазолу и амфотерицину В. При этом данный вид в 2016–2018 гг. по частоте выявления в окружающей среде занимал доминирующее положение, а в 2019 г. высевался из клинического материала с той же частотой, что и *C.glabrata*, *C.krusei*, причём чувствительность к антимикотикам была отмечена у 15,38–76,92% штаммов в зависимости от использованного антимикотического препарата (см. табл. 1).

Флуконазол является часто назначаемым препаратом как в качестве препарата первой помощи (эмпирический выбор), так и в профилактических целях. Заметим, что отношение к его использованию неоднозначно. Так полагают, что назначение флуконазола является фактором риска для развития кандидемий, обусловленных *C.krusei* и *C.glabrata* [19]. В Московском регионе среди клинических изолятов в 2014 г. от 57,4 до 100% штаммов *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.guilliermondii*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* были чувствительны к флуконазолу, а в 2019 г. 100% штаммов *C.parapsilosis*, *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.lusitaniae* оказались резистентными по отношению к флуконазолу, также как и 33,33% штаммов *C.intermedia* (см. табл. 1). Наши данные значительно отличаются от показателей чувствительности к флуконазолу в других регионах. Например, в Хабаровске выявили 3,8% штаммов *C.albicans*, 10% штаммов *C.glabrata* и 0% штаммов *C.tropicalis*, резистентных к флуконазолу [20]. В Израиле в 2005–2007 гг. резистентными к флуконазолу были 100% штаммов *C.krusei* и *C.guilliermondii*, 13,3% — *C.parapsilosis*, 8,8% — *C.glabrata*, 6,7% — *C.tropicalis* [13].

В странах Латинской Америки в 2008–2010 гг. резистентность показали 100% штаммов *C.krusei*, 7,1% — *C.glabrata*. 100% штаммов *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.guilliermondii*, *C.parapsilosis* были чувствительны к флуконазолу [14]. Исследования в Китае в 2009–2014 гг. показали, что среди клинических изолятов резистентными были *C.krusei* (100%), *C.guilliermondii* (29%), *C.glabrata* (18,7%), *C.tropicalis* (13,3%), *C.intermedia* (10%), *C.parapsilosis* (5,3%), *C.albicans* (0,5%) [18].

Среди выделенных в Австралии 2014–2015 гг. клинических изолятов *C.albicans*, *C.parapsilosis*,

C.glabrata, *C.tropicalis*, *C.krusei* резистентностью к флуконазолу обладали 0,9, 1,2, 6,8, 16,7, 23,1% штаммов, соответственно [17]. Чувствительность к амфотерицину В часто встречающихся видов дрожжевых грибов сохраняется в разных регионах [14, 17]. Возможно, значительно меньшая встречаемость резистентности к флуконазолу в других регионах в отличие от Москвы связана с введением в лечебную практику иных антифунгальных препаратов.

Изучение текущей чувствительности дрожжевых грибов рода *Candida* к противогрибным препаратам показывает, что в течение 5 лет значительно изменился профиль противогрибной активности рассмотренных антифунгальных препаратов. В группе азоловых антимикотиков более очевидна разница между препаратами (см. табл. 2). Эффективность противогрибного действия азоловых антимикотиков на клинические изоляты уменьшается в ряду: согласно данным 2014 г. — клотримазол, интраконазол, флуконазол; согласно данным 2019 г. — клотримазол, интраконазол, флуконазол. Несмотря на то что обе последовательности антифунгальных препаратов совпадают, разница в активности существенна. Так, в 2019 г. общее количество чувствительных к антимикотикам клинических штаммов грибов уменьшилось на 19,51, 35,58 и 53,52% по отношению к клотримазолу, интраконазолу и флуконазолу, соответственно. Эффективность противогрибного (фунгицидного) действия азоловых антифунгальных препаратов на природные изоляты, согласно данным 2014 г., одинакова для всех антимикотиков; согласно данным 2019 г., уменьшается в ряду: клотримазол, интраконазол, флуконазол. В этом случае штаммов, чувствительных к клотримазолу, стало меньше на 4,16%, к

интраконазолу — на 27,15%, к флуконазолу — на 44,39%. Снижение чувствительности дрожжевых грибов к полиеновым антифунгальным препаратам в течение пяти лет составило 23,89 и 24,39% клинических штаммов и 22,55 и 7,61% штаммов из природного материала для нистатина и амфотерицина В, соответственно. Интересно отметить повышенное количество чувствительных к флуконазолу природных изолятов по отношению к клиническим изолятам (на 9,37%) в 2016–2019 гг. Вполне возможно, что дальнейшие наблюдения позволят вывести некоторые закономерности перетекания отдельных флуконазолочувствительных штаммов дрожжевых грибов из окружающей среды в группу этиологических агентов кандидозов.

Таким образом, в Москве расширился спектр видов грибов рода *Candida*, выделяемых в качестве этиологических агентов кандидозов среди иммунокомпрометированных людей, причём частота встречаемости варьируется от 21,95% (*C.parapsilosis*) до 7,32% (*C.intermedia*). Наиболее эффективными антифунгальными препаратами *in vitro* являются клотримазол, нистатин и амфотерицин В. В течение пяти лет наблюдения (2014–2019 гг.) чувствительность дрожжевых грибов рода *Candida* к рассмотренным антимикотикам снизилась на 19,51–53,52% среди клинических изолятов и на 4,16–44,39% — среди природных изолятов. Флуконазол показал самую низкую фунгицидную активность (17,07% штаммов). Предполагаем, что на распространение резистентности среди известных и перспективных участников инфицирования макроорганизма дрожжевыми грибами рода *Candida* влияют коэволюционные процессы, протекающие внутри сообщества микроорганизмов, под воздействием антропогенных факторов.

ЛИТЕРАТУРА

- Poikonen E., Lyytikäinen O., Anttila V.J., Ruutu P. Candidemia in Finland, 1995–1999. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug; 9 (8): 985–990. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug; 9(8): 985–990. doi: 10.3201/eid0908.030069
- Chen S., Slavin M., Nguyen Q., Marriott D., Playford E.G., Ellis D., Sorrell T. Active Surveillance of Candidemia, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2006 Oct; 12(10): 1508–1516. doi: 10.3201/eid1210.060389
- Low C.-Y., Rotstein C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. 2011. doi: 10.3410/M3-14 <http://fl1000.com/reports/m/3/14>.
- Карпова Е.П., Тулупов Д.А., Вагина Е.Е. Терапии кандидозного поражения глотки у детей и подростков. *Педиатрия.* 2009; 88 (5): 117–119. / Karpova E.P., Tulupov D.A., Vagina E.E. Terapii kandidoznogo porazheniya glotki u detey i podrostkov. *Pediatrya.* 2009; 88 (5): 117–119. [in Russian] <https://cyberleninka.ru/article/v/terapiya-kandidoznogo-porazheniya-glotki-u-detey-i-podrostkov>
- Yao D., Chen J., Chen W., Li Z., Hu X. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* from two hospitals in China. *Infect Drug Resist.* 2019 Apr 5; 12:771–781. doi: 10.2147/IDR.S202058.
- Sun M., Chen C., Xiao W., Chang Y., Liu C., Xu O. Increase in *Candida Parapsilosis* Candidemia in Cancer Patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2019; 11(1): e2019012. doi: 10.4084/MJHID.2019.012.
- Krcmery V., Barnes A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002 Apr; 50 (4): 243–60. doi:10.1053/jhin.2001.1151.
- Torosantucci A., Bromuro C., Chiani P., Bernardis F.D., Berti F., Galli C. et al. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med.* 2005 Sep 5; 202 (5): 597–606. doi: 10.1084/jem.20050749
- Moragues M.D., Omatexebarría M.J., Elguezabal N., Sevilla M.J., Conti S., Polonelli L., Pontón J. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C.albicans* activities. *Infect Immun.* 2003 Sep; 71 (9): 5273–5279. doi: 10.1128/IAI.71.9.5273-5279.2003
- Li R., Zhang R., Yang Y., Wang X., Yi Y., Fan P. et al. CGA-N12, a peptide derived from chromogranin A, promotes apoptosis of *Candida tropicalis* by attenuating mitochondrial functions. *Biochem J.* 2018 Apr 16; 475 (7): 1385–1396. doi: 10.1042/BCJ20170894.
- Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., Clancy C.J., Marr K.A., Ostrosky-Zeichner L. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016 Feb 15; 62 (4): e1–e50. Published online 2015 Dec 16. doi: 10.1093/cid/civ933
- Pfaller M.A., Boyken L., Hollis R.J., Messer S.A., Tendolkar S., Diekema D.J. Global surveillance of *in vitro* activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. *J.Clin.Microbiol.* 2006 Oct; 44 (10): 3533–3538. doi:10.1128/JCM.00872-06.
- Ben-Ami R., Olshtain-Pops K., Krieger M., Oren I., Bishara J., Dan M. et al. Antibiotic Exposure as a Risk Factor for Fluconazole-Resistant *Candida* Bloodstream Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 2518–2523. DOI: 10.1128/AAC.05947-11.
- Nucci M., Queiroz-Telles F., Alvarado-Matute T., Tiraboschi I.N., Cortes J., Zurita J. et al. (2013a). Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS ONE* 8: e59373. doi: 10.1371/journal.pone.0059373.
- Chakrabarti A., Sood P., Rudramurthy S.M., Chen S., Kaur H., Kapoor M. et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med.* 2015 Feb; 41 (2): 285–295. doi: 10.1007/s00134-014-3603-2. Epub 2014 Dec 16.
- Karabacak N., Alem N. Antifungal susceptibility profiles of *Candida* species to triazole: application of new CLSI species-specific clinical

breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of antifungal resistance. Mikrobiyol Bul. 2016 Jan; 50 (1): 122–132.

17. Chapman B., Slavin M., Marriott D., Halliday C., Kidd S., Arthur I. et al. Changing epidemiology of candidaemia in Australia. J Antimicrob Chemother 2017; 72: 1103–1108. doi:10.1093/jac/dkw422.
18. Xiao M., Sun Z.-Y., Kang M., Guo D.-W., Liao K., Chen S. et al. Five-year national surveillance of invasive candidiasis: species distribution and azole susceptibility from the China hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study. J. Clinical. Microbiol. 2018 Jul. 56. <https://jcm.asm.org/content/jcm/56/7/e00577-18.full.pdf>
19. Hachem R., Hanna H., Kontoyiannis D., Jiang Y., Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida kru-*

sei as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. Cancer. 2008 Jun; 112 (11): 2493–2499. doi: 10.1002/cncr.23466.

20. Бондаренко А.П., Троценко О.Е., Зайкина О.Н., Корита Т.В. Участие грибов рода *Candida* в фарингеальной патологии у взрослых и часто болеющих детей. Бюллетень. 2015. Выпуск 58: 53–58. / Bondarenko A.P., Trocenko O.E., Zajkina O.N., Korita T.V. Uchastie gribov roda *Candida* v faringeal'noj patologii u vzrosly'x i chasto boleyushih detej. Byulleten'. 2015. Vy'pusk 58: 53–58. [in Russia] https://studylib.ru/doc/2519254/byulleten._vypusk-58--2015-53-udk-616.327.3-002-616-053.4-

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ахапкина И. Г. — к. б. н. ведущий научный сотрудник лаборатории «Экологической биотехнологии» ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова

Глушакова А. М. — к. б. н. научный сотрудник лаборатории «Экологической биотехнологии» ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова

Родионова Е. Н. — лаборант лаборатории «Экологической биотехнологии» ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова

Качалкин А. В. — к. б. н. ведущий научный сотрудник кафедры биологии почв факультета почвоведения ФГБОУВО Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Корректирующее действие фукоидана, сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens*, при формировании специфического иммунного ответа против вирусов сезонного гриппа у пожилых людей

*Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹, С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ², Е. В. ПЕРСИЯНОВА², Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Т. П. СМОЛИНА¹, А. К. ГАЖА¹, Н. М. ШЕВЧЕНКО³, Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА³, С. П. ЕРМАКОВА³, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹

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

² Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

The Corrective Effect of Fucoidan, a Sulfated Polysaccharide Extracted from Brown Algae *Fucus evanescens*, in the Formation of a Specific Immune Response Against Seasonal Influenza Viruses in the Elderly

*T. S. ZAPOROZHETS¹, S. P. KRYZHANOVSKY², E. V. PERSIANOVA², T. A. KUZNETSOVA¹, T. P. SMOLINA¹, A. K. GAZHA¹, N. M. SHEVCHENKO³, T. N. ZVYAGINTSEVA³, S. P. ERMAKOVA³, N. N. BESEDNOVA¹

¹ Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² Medical Association of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

³ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

Установлены особенности дисфункции иммунной системы у пожилых людей при формировании специфического иммунного ответа на вакцинацию против сезонного гриппа в зависимости от уровня сероконверсии. Показано корректирующее действие фукоидана — сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens*, сопровождающееся увеличением экспрессии активационных молекул CD69 и CD86 на моноцитах, снижением плотности экспрессии CD20 на В-лимфоцитах, а также увеличением относительного содержания клеток памяти (CD4⁺CD45RO⁺-Т-лимфоцитов и цитотоксических CD8⁺CD45RO⁺-Т-лимфоцитов). Фукоидан из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* может применяться для повышения эффективности вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей.

Ключевые слова: вакцинация, грипп, адъюванты, фукоидан, сульфатированные полисахариды, бурые водоросли, пожилые люди.

The article establishes the particularities of immune system dysfunction in the elderly during formation of a specific immune response to vaccination with a seasonal influenza vaccine depending on the level of seroconversion. The corrective effect of fucoidan — a sulfated polysaccharide extracted from brown algae *Fucus evanescens* — was shown in the formation of a specific immune response, accompanied by an increase in the expression of the activation molecules CD69 and CD86 on monocytes, a decrease in the expression density of CD20 on B-lymphocytes, and an increase in the relative content of memory cells (CD4⁺CD45RO⁺-T-lymphocytes and cytotoxic CD8⁺CD45RO⁺-T-lymphocytes). Fucoidan extracted from the brown algae *Fucus evanescens* of the Sea of Okhotsk can be used to increase the effectiveness of seasonal influenza vaccination in the elderly.

Keywords: vaccination, influenza, adjuvants, fucoidan, sulfated polysaccharides, brown algae, elderly people.

Введение

Грипп — острая вирусная инфекция — вызывает значительную заболеваемость населения во всех возрастных группах, однако пожилые люди особенно уязвимы из-за риска развития серьёзных осложнений. Старение сопровождается уменьшением синтеза специфических антител к

вирусу гриппа. Исследования ряда авторов показали, что большинство пожилых пациентов остаются серонегативными, а серопозитивные — не отвечают динамикой специфических антител, что приводит к сокращению периода защиты [1–3]. Эти изменения связаны с физиологическим нарушением иммунной системы, известным как иммунное старение [4, 5]. В наибольшей степени возрастным изменениям подвержено адаптивное звено иммунной системы, включая Т- и В-клеточную иммунологическую память, формирующую-

© Коллектив авторов, 2020

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

ся в ответ на введение вакцинного штамма, что снижает эффективность вакцин и повышает риск естественного инфицирования [5]. Со стороны В-системы наиболее очевидным и доказанным причинным фактором, ответственным за снижение реакции на вакцины у пожилых людей, является нарушение процесса дифференцировки В-клеток памяти в плазматические клетки [6]. Определённая связь существует между поствакцинальным накоплением Т-клеток памяти в периферической крови и наличием системного гуморального ответа на прививку [7]. Иммунный статус пожилых пациентов также характеризуется нарушением презентации антигена дендритным клеткам, пониженной антимикробной активностью нейтрофилов и макрофагов, снижением NK-киллинга [8, 9].

Перспективным решением проблемы, связанной с преодолением низкой эффективности вакцинации у пожилых людей, является использование средств, восстанавливающих адекватное реагирование на введение различных вакцинных препаратов, в том числе соединений, действие которых основывается на стимуляции Толл-подобных рецепторов (TLR) [10, 11]. К числу таких соединений относятся сульфатированные полисахариды из морских бурых водорослей — фукоиданы. Ранее нами была установлена способность фукоидана из *Fucus evanescens* выступать в качестве лигандов TLR клеток врождённого иммунитета, специфически связываться с TLR2 и TLR4, активировать ядерный фактор транскрипции NF- κ B [12, 13], повышать иммуногенность инактивированного вируса гриппа А/Калифорния [14]. Мы также установили эффективность применения полисахарида в составе БАД Фуколам экстра при вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей [15].

Цель исследования — установить механизмы действия фукоидана на клетки врождённого и адаптивного иммунитета при развитии поствакцинального противогриппозного иммунитета у пожилых людей.

Материал и методы

Исследование проведено в эпидемический сезон гриппа 2018–2019 гг. в соответствии с основными этическими принципами эпидемиологических исследований и Хельсинкской декларации. Протокол испытания и все соответствующие документы были одобрены Этическим комитетом Медицинского объединения ДВО РАН.

На условиях информированного добровольного согласия 40 участников в возрасте от 58 до 82 лет (средний возраст $64,4 \pm 2,4$) иммунизировали вакциной Совигрипп однократно внутримышечно в верхнюю треть наружной поверхности плеча (в дельтовидную мышцу) в объёме 0,5 мл (1 доза). Участники опытной группы начали принимать БАД Фуколам экстра, начиная со дня вакцинации по 1 капсуле 2 раза в день в течение 30 дней.

Биологически активная добавка к пище Фуколам экстра на основе фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* (капсулы по 0,1 г) разрешена к применению (свидетельство

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о государственной регистрации № RU.77.99.88.003.E.000398.02.16 от 01.02.2016), изготовлена Тихоокеанским институтом биоорганической химии ДВО РАН. Показатели безопасности Фуколам экстра не превышают допустимых уровней, регламентируемых СанПин 2.3.2.1078-01 для препаратов из водорослей.

Биологический материал. Периферическую кровь у участников исследования собирали натощак из кубитальной вены до вакцинации и через 5 нед. после вакцинации. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии (цитофлуориметр FACScan, Becton Dickinson, США). Оценивали активность клеточного звена врождённого иммунитета (моноцитов) — по экспрессии костимулирующих молекул CD69, CD86, свидетельствующих об активации Т-клеток памяти ($CD4^+CD45RO^+$ и $CD8^+CD45RO^+$) и субпопуляций В-лимфоцитов, завершающих дифференцировку в плазматические клетки ($CD20^+CD38^{++}$) с использованием моноклональных антител: CD3, CD4, CD8, CD20, CD38, CD14, CD86, CD69, CD45RO (BekmanCoulter, США) и соответствующих изотопических контролей. Гейтирование субпопуляций лимфоцитов и гранулоцитов осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Моноциты дифференцировали от других клеток по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии клетками молекул CD14. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток. Экспрессию молекул на поверхности клеток оценивали по количеству клеток, меченых антителами (в %), и уровню средней интенсивности флуоресценции (MFI — mean fluorescence intensity).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 10. Использовали проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений (W -критерий Шапиро–Уилка). Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали t -критерий Стьюдента (для независимых выборок и для двух связанных между собой вариационных рядов); при ненормальном распределении количественных признаков использовали непараметрический критерий W — Вилкоксона (применяемого для сравнения выборок с попарно связанными вариантами) и непараметрический критерий Манна–Уитни (для сравнения двух попарно несвязанных между собой вариационных рядов). Выборочные параметры, приводимые далее в таблицах, имеют следующие обозначения: W — критерий Шапиро–Уилка, объём анализируемой выборки (n), p — достигнутый уровень значимости. Все значения p являются двусторонними, $p < 0,05$ считалось существенным.

Результаты и обсуждение

При антигенной стимуляции в процессе дифференцировки в плазматические клетки В-лимфоциты теряют большинство специфических В-клеточных маркеров (в том числе CD20) и начинают усиленно экспрессировать CD38 [16]. Мы проанализировали ответы В-клеток пожилых людей и показали, что относительное содержание $CD20^+CD38^{++}$ -лимфоцитов (промежуточные клетки, отражающие процесс дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки) до начала вакцинации и после неё было значимо выше в подгруппах участников, ответивших впоследствии на вакцинацию (в опытной и контрольной группах) (табл. 1). Значимого изменения $CD20^+CD38^{++}$ -лимфоцитов в ответ на вакцинацию не наблюдалось ни в одной из групп.

Таблица 1. Клетки адаптивного иммунитета у пожилых людей при вакцинации против сезонного гриппа

Показатели	Подгруппа	Группа 1 (контроль) (n=15)			Группа 2 (фукоидан) (n=15)		
		W	M±σ	p	W	M±σ	p
Т-лимфоциты CD4+CD45RO+ (%)	Ответ +	0,98	53,1±13,0	0,018	0,96	52,9±16,9	0,014
		0,96	66,9±9,9		0,85	57,7±12,8	
	Ответ –	0,94	75,0±10,2*	0,255	0,86	62,3±13,9*	0,142
		0,85	76,9±9,2		0,79	64,8±15,3	
Т-лимфоциты CD8+CD45RO+ (%)	Ответ +	0,92	32,1±10,4	0,315	0,85	29,7±11,9	0,000
		0,95	29,4±12,6		0,90	38,5±14,9	
	Ответ –	0,91	34,1±13,2	0,403	0,96	24,7±6,0	0,528
		0,83	31,4±8,6		0,92	29,3±5,1	
В - лимфоциты CD20+CD38++ (% от CD20+)	Ответ +	0,84	20,7±4,5*	0,343	0,98	16,8±4,5*	0,343
		0,91	20,0±11,6*		0,84	17,4±5,5*	
	Ответ –	0,92	13,5±8,1*	0,519	0,95	10,4±1,5*	0,519
		0,79	13,5±6,4*		0,97	11,1±2,9*	
В - лимфоциты CD38+ (MFI)	Ответ +	0,79	66,6±15,8	0,120	0,98	70,8±20,2	0,960
		0,86	80,2±16,2		0,94	70,7±19,7	
	Ответ –	0,85	64,4±31,1	0,372	0,96	79,1±13,4	0,479
		0,89	61,2±28,5		0,89	77,1±15,9	
В - лимфоциты CD20+ (MFI)	Ответ +	0,99	310,6±126	0,449	0,90	398,6±93	0,015
		0,90	340,6±61		0,92	342,8±108	
	Ответ –	0,84	416,1±117	0,203	0,88	312,5±50	0,559
		0,84	398,6±1127		0,83	291,7±108	

Примечание. В числителе – значения показателей до вакцинации; в знаменателе – значения показателей после вакцинации; Критерий Shapiro–Wilk: для всех значений W – $p > 0,05$ (параметры имеют нормальное распределение; p – значимость различий между показателями до и после вакцинации; * – значимость различий между показателями в подгруппах Ответ+ и Ответ– ($p < 0,05$)).

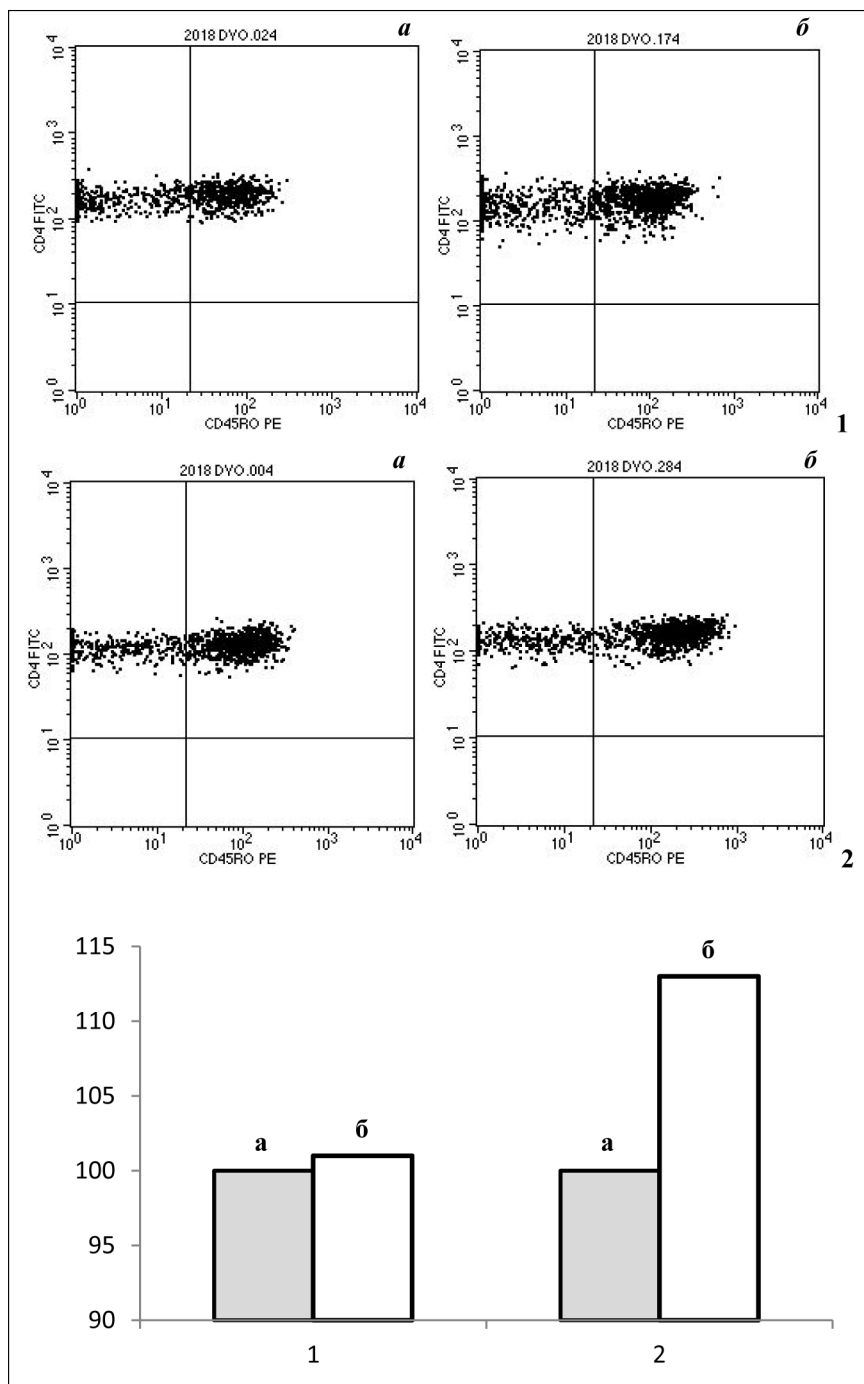
Вместе с тем, анализ результатов участников, стратифицированных по сероконверсии выявил, что снижение плотности экспрессии CD20 на В-лимфоцитах (MFI) регистрировалось только у лиц, получавших фукоидан, и ответивших на вакцинацию (подгруппа Фукоидан Ответ+). У остальных участников начального изменения уровня экспрессии CD20 на В-лимфоцитах не наблюдалось. Число индивидуумов, у которых уровень экспрессии CD20 повышался, в контрольной группе составило 80%, в опытной группе – 40%.

Полученные нами результаты подтверждают положение о нарушении процесса дифференцировки В-клеток памяти в плазматические клетки у пожилых людей и согласуются с данными других авторов, связывающих с этим низкую эффективность вакцинации (кратность увеличения титров антител) [5, 16, 17], а также демонстрируют тенденцию к нормализации процесса при употреблении фукоидана.

Полноценность развития поствакцинального иммунного ответа к возбудителям инфекций зависит от способности вакцинных штаммов индуцировать не только В-клеточную, но и Т-клеточную иммунологическую память. Генерирование специфического Т-клеточного иммунитета регулируется множеством детерминант, которые определяют пролиферацию и функциональное созревание эффекторных Т-клеток, а также их последующую дифференцировку в Т-клетки памяти. Нарастание пула клеток памяти с фенотипом CD4⁺CD45RO⁺ (так называемых функционально неполноценных «суррогатных клеток памяти»),

является наиболее ярким признаком иммуносупрессии [18, 19]. Размножившиеся клоны таких клеток занимают большую долю доступного для пролиферации пространства в крови, и соответственно снижают возможность наивных Т-клеток отвечать активацией на новый антиген [20].

Наши результаты подтверждают данные литературы и демонстрируют, что средние значения показателя уровня экспрессии маркера активации CD45RO⁺CD4⁺ Т-клетками у участников обеих групп до вакцинации были значимо выше такового у здоровых доноров (39,2±7,7, $p < 0,05$). При этом относительное содержание Т-клеток памяти с фенотипом CD4⁺CD45RO⁺ (табл. 1) было значимо выше среди лиц, не ответивших на вакцинацию (70,2±11,7%), чем у тех, кто на неё ответил (51,9±11,1%), $p < 0,05$). После вакцинации средние значения показателя активации Т-клеток значимо отличались от базового уровня в подгруппах Ответ+ (рисунок). Следует, однако отметить, что связь между поствакцинальным накоплением Т-клеток памяти в периферической крови и ответом на прививку не была абсолютной, поскольку увеличение доли CD4⁺CD45RO⁺ клеток после вакцинации происходило также и у части лиц без такого ответа. Вместе с тем кратность увеличения уровня CD4⁺CD45RO⁺ у пожилых людей была невысокой, по сравнению с таковой у молодых индивидуумов [20]. Применение фукоидана участниками опытной группы сопровождалось и более выраженным ответом CD8⁺Т-клеток, участвующих в формировании защитного противовирус-



Показатели активации Т-клеток.

По оси ординат — CD4⁺CD45RO⁺-клетки (%) у лиц без сероконверсии (1) и с сероконверсией (2) до (а) и после (б) вакцинации.

ного иммунитета [21]. Относительное содержание цитотоксических клеток памяти CD8⁺CD45RO⁺ до вакцинации в подгруппах Ответ+ и Ответ- было сопоставимым. После вакцинации содержание этих клеток значительно увеличилось у всех участников в подгруппе Фукоидан Ответ+, тогда как в подгруппе Контроль Ответ+ показатель не изменялся (см. табл. 1). Среди лиц, не ответивших на вакцинацию, содержание этих клеток также не изменялось.

увеличение экспрессии CD86 на моноцитах. Вместе с тем, в опытной группе экспрессия CD86 увеличивалась у 85% серопозитивных индивидуумов, в контрольной группе — в 50% случаев. После вакцинации средние значения показателя плотности CD86 и CD69 молекул на моноцитах значительно увеличивались только у участников в подгруппе Фукоидан Ответ+. Среди лиц, не ответивших на вакцинацию, плотность рецепторов на клетках также не изменялась (табл. 2).

Снижение адаптивных иммунных реакций против вирусного патогена может быть связано с дефектами врожденной иммунной системы [22, 23]. В норме стимуляция TLR моноцитов или дендритных клеток приводит к активации костимулирующих молекул CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) — лигандов для активирующего рецептора CD28 и ингибиторного рецепторного цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка-4 (CTLA-4) на Т-клетках [24]. В трансдукции активирующих сигналов также участвуют молекулы CD69 [25] и CD16 [26]. Дисрегуляция врожденной иммунной системы у пожилых связана, в числе прочего, с изменением экспрессии этих молекул на моноцитах. Снижение экспрессии приводит к уменьшению костимуляции и эффекторной активации Т-клеток и, как следствие, нарушению ответа на вакцинацию. Повышенная экспрессия молекул активации отражает увеличение количества клеток, которые перепроизводят цитокины Th1-типа [9], индуцируют провоспалительное состояние и также изменяют передачу сигналов, процессы дифференцировки и апоптоза иммунных клеток [27]. Некоторыми авторами изменённая экспрессия костимулирующих молекул после стимуляции *in vitro* рассматривается в качестве предиктора серопротекторного ответа на вакцину против гриппа у пожилых людей [28, 29].

В наших исследованиях мы наблюдали дивергентные ответы на вакцину — снижение или

Таблица 2. Изменение экспрессии CD69 и CD86 на моноцитах периферической крови пожилых людей при вакцинации против сезонного гриппа

Показатели	Подгруппа	Группа 1 (контроль) (n=15)			Группа 2 (фукоидан) (n=15)		
		W	M±σ (Me) (LQ-UQ)	p	W	M±σ (Me) (LQ-UQ)	p
Моноциты CD69 (MFI)	Ответ +	0,93	15,1±4,3	0,327	0,88	14,7±3,7	0,024
		0,81	15,9±3,2		0,92	17,6±4,1	
	Ответ –	0,95	13,6±1,8	0,714		13,9±1,0	0,902
		0,89	13,9±1,3			13,9±0,7	
Моноциты CD69 (%)	Ответ +	0,81	18,2±3,2*	0,380	0,91	20,6±6,3*	0,048
		0,90	20,7±5,8		0,89	27,8±8,4	
	Ответ –	0,66	22,4±4,7	0,670	0,74 ¹	25,35 (13,90–27,10)	0,115
		0,77 ¹	22,00 (12,10–22,40)		0,84	23,8±9,6	
Моноциты CD86 (MFI)	Ответ +	0,86	46,6±14,4	0,924	0,761	48,85 (27,20–53,70)	0,003
		0,93	47,3±9,8		0,97	55,4±10,0	
	Ответ –	0,88	52,5±8,4*	0,632	0,92	30,23±10,6*	0,132
		0,95	47,1±19,4		0,95	23,4±9,6*	
Моноциты CD86 (%)	Ответ +	0,88	56,7±14,4	0,541	0,85	43,9±14,9	0,005
		0,97	52,9±14,2		0,95	57,9±14,4	
	Ответ –	0,85	51,1±8,4*	0,875	0,84	35,8±10,5*	0,043
		0,97	51,2±15,6		0,671	32,45 (17,80–34,30)	

Примечание. В числителе – значения показателей до вакцинации; в знаменателе – значения показателей после вакцинации; *p*-значимость различий между показателями до и после вакцинации; * – значимость различий между показателями в подгруппах Ответ+ и Ответ– (*p*<0,05). W – Shapiro–Wilk; ¹ – *p*<0,05 – уровень значимости, соответствующий данному критерию W (при *p*<0,05 параметр имеет отклонение от нормального).

Таким образом, наше исследование подтвердило, что эффективность вакцин у пожилых людей снижается из-за низких показателей сероконверсии, возникающих в результате развития более слабого иммунологического ответа на вакцинацию, что требует разработки дополнительных стратегий профилактики для этой категории населения.

Корректирующее действие фукоидана — сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens* — при формировании специфического иммунного ответа сопровождается увеличением экспрессии CD69 и CD86 на моноцитах и снижением плотности экспрессии CD20 на В-лимфоцитах, увеличением относительного содержания клеток памяти (CD4⁺CD45RO⁺ — Т-лимфоцитов и цитотоксических CD8⁺CD45RO⁺Т-лимфоцитов).

Полученные данные по усилению ответа на вакцинацию против гриппа при приёме фукоидана из *Fucus evanescens* соответствуют мнению исследователей, полагающих, что применение адъювантов и иммуномодуляторов в сочетании с противогриппозной вакциной может приводить к усилению иммунного ответа, формированию

быстрой эндогенной защиты, стимуляции клеточного звена иммунитета.

Важным моментом с точки зрения использования фукоидана для усиления ответа на вакцины против гриппа является возможность осуществления эффекта при пероральном применении, подтвержденная в экспериментальных [30] и клинических исследованиях [31].

Учитывая непоследовательную связь антигенного ответа на противогриппозную вакцину с защитой от инфекции у пожилых людей, представляется необходимым проведение дальнейших исследований по количественной оценке фенотипа клеток врожденного и адаптивного иммунитета при оценке действия вакцин, а также определение стратегий, позволяющих управлять или обходить риск неблагоприятных исходов среди тех, кто проявляет признаки иммунного старения.

Исследование выполнено при поддержке Президиума ДВО РАН (проект №18-5-084).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sambhara S., McElhaney J. E. Immunosenescence and influenza vaccine efficacy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 333: 413–429.
2. Panda A., Arjona A., Sapey E., Bai F., Fikrig E., Montgomery R.R., Lord J.M., Shaw A.C. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009; 30 (7): 325–333.
3. Kannan S., Kurupati R., Doyle S., Freeman G., Schmader K., Ertl H. BTLA expression declines on B cells of the aged and is associated with low responsiveness to the trivalent influenza vaccine. *Oncotarget* 2015; 6: 19445–1955.
4. Weiskopf D., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transplant Int* 2009; 22: 1041–1050.
5. Wagner A., Garner-Spitzer E., Jasinska J., Kollaritsch H., Stiasny K., Kundi M. et al. Age-related differences in humoral and cellular immune

responses after primary immunisation: indications for stratified vaccination schedules. *Sci Rep* 2018; 8: 9825–936.

6. Frasca D., Diaz A., Romero M., Blomberg B. The generation of memory B cells is maintained, but the antibody response is not, in the elderly after repeated influenza immunizations. *Vaccine* 2016; 34: 2834–2840.
7. Lazuardi L., Jenewein B., Wolf A.M., Pfister G., Tzankov A., Grubeck-Loebenstein B. Age-related loss of naive T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. *Immunology* 2005; 114: 37–43.
8. Van Duin D., Allore H.G., Mohanty S., Ginter S., Newman F.K., Belshe R.B. et al. Pre-vaccine determination of the expression of costimulatory B7 molecules in activated monocytes predicts influenza vaccine responses in young and older adults. *J Infect Dis* 2007; 95: 1590–1597.
9. Panda A., Qian F., Mohanty S., van Duin D., Newman F.K., Zhang L. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic

- cells predicts influenza vaccine response. *Immunol* 2010; 184: 2518–2527.
10. Начарова Е.П., Харит С.М., Петленко С.В. Превентивная иммунокоррекция как способ повышения эффективности и безопасности вакцинации. *Terra Medica*. — 2004. — № 33. — С. 3–7. / *Nacharova E.P., Kharit S.M., Petlenko S.V.* Preventivnaya immunokorreksiya kak sposob povysheniya effektivnosti i bezopasnosti vaksinatcii. *Terra Medica* 2004; 33: 3–7. [in Russian]
 11. Munir M., Mosaheb., Michael L. R., Lee M. W. Toll-like receptor ligand-based vaccine adjuvants require intact MyD88 signaling in antigen-presenting cells for germinal center formation and antibody production. *Front Immunol* 2017; 8: 225.
 12. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Персиянова Е.В., Хотимченко Ю.С., Беседнова Н.Н. Перспективы использования сульфатированных полисахаридов бурых водорослей как вакцинных адъювантов. *Биология моря*. — 2016. — № 42. — С. 399–406. / *Kuznetsova T.A., Zaporozhets T.S., Persyanova E.V., Khotimchenko Yu.S., Besednova N.N.* Perspektivy ispol'zovaniya sul'fatirovannykh polisakharidov burykh vodoroslej kak vaksinnnykh ad'jyuvantov. *Biologiya morya* 2016; 42: 399–406. [in Russian]
 13. Макаренкова И.Д., Тухватулин А.И., Ермакова С.П., Логунов Д.Ю., Джаруллаева А.Ш., Ерохова А.С. Влияние фукоидана и трансформированных дериватов из бурой водоросли *Fucus evanescens* на активацию транскрипционного ядерного фактора NF-κB. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. — 2018. — № 3. — С. 26–32. / *Makarenkova I.D., Tukhvatulin A.I., Ermakova S.P., Logunov D.Yu., Dzharrullaeva A.Sh., Erokhova A.S.* Vliyaniye fukoidana i transformirovannykh derivatov iz buroy vodorosli *Fucus evanescens* na aktivatsiyu transkriptsiionnogo yadernogo faktora NF-κB. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka* 2018; 3: 26–32. [in Russian]
 14. Кузнецова Т.А., Иванушко Л.А., Персиянова Е.В., Шутикова А.Л., Ермакова С.П., Хотимченко М.Ю. et al. Оценка адъювантных эффектов фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и его структурных аналогов для усиления аналогов для эффективности вакцинации. *Биомед хим.* — 2017. — № 63. — С. 553–558. / *Kuznetsova T.A., Ivanushko L.A., Persyanova E.V., Shutikova A.L., Ermakova S.P., Khotimchenko M.Yu.* et al. Otsenka ad'jyuvantnykh effektivnykh fukoidana iz buroy vodorosli *Fucus evanescens* i ego strukturnykh analogov dlya usileniya analogov dlya effektivnosti vaksinov. *Biomed khim* 2017; 63: 553–558. [in Russian]
 15. Запорожец Т.С., Крыжановский С.П., Персиянова Е.В., Кузнецова Т.А., Шутикова А.Л., Шевченко Н.М. et al. Эффективность применения фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* при вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей. *Антибиотики и химиотер.* — 2019. — Т. 64. — № 4–5. — С. 32–38. / *Zaporozhets T.S., Kryzhanovskij S.P., Persyanova E.V., Kuznetsova T.A., Shutikova A.L., Shevchenko N.M.* et al. Effektivnost' primeneniya fukoidana iz buroy vodorosli Okhotskogo morya *Fucus evanescens* pri vaksinatcii protiv sezonnogo grippa u pozhilykh lyudej. *Antibiotiki i khimioter* 2019; 64: 4–5: 32–38. [in Russian]
 16. Jourdan M., Caraux A., De Vos J., Fiol G., Larroque M., Cognot C. et al. An *in vitro* model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 2009; 114: 5173–5181.
 17. Goldeck D., Theeten H., Hassouneh F., Oettinger L., Wistuba-Hamprecht K., Cools N. et al. Frequencies of peripheral immune cells in older adults following seasonal influenza vaccination with an adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2017; 35: 4330–4338.
 18. Найхин А.Н., Кореньков Д.А., Петухова Г.Д., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Оценка Т-клеточной иммунологической памяти по экспрессии молекул CD45 у людей, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной. *Мед иммунол.* — 2008. — № 10. — С. 535–542. / *Najkhin A.N., Koren'kov D.A., Petukhova G.D., Chirkova T.V., Grigor'eva E.P., Rudenko L.G.* Otsenka T-kletochnoj immunologicheskoy pamyati po ekspressii molekul CD45 u lyudej, privitykh zhivoj reassortantnoj grippoznoj vaksinoj. *Med immunol* 2008; 10: 535–542. [in Russian]
 19. Weyand C.M., Goronzy J.J. Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 5: S422–428.
 20. McElhaney J., Pinkoski M., Meneilly G. Changes in CD45 isoform expression vary according to the duration of T-cell memory after vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 73–81.
 21. Seder R., Darrah P., Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 247–258.
 22. Plowden J., Renshaw-Hoelscher M., Gangappa S., Engleman C., Katz J.M., Sambhara S. Impaired antigen-induced CD8⁺ T cell clonal expansion in aging is due to defects in antigen presenting cell function. *Cell Immunol* 2004; 229: 86–92.
 23. van den Biggelaar A.H., Huizinga T.W., de Craen A.J., Gussekloo J., Heijmans B.T., Frölich M. et al. Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1407–1414.
 24. Sharpe A.H., Freeman G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116–126.
 25. Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15: 479–483.
 26. Theorell J.I., Gustavsson A.L., Tesi B., Sigmundsson K., Ljunggren H.G., Lundbäck T. et al. Immunomodulatory activity of commonly used drugs on Fc-receptor-mediated human natural killer cell activation. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63: 627–641.
 27. Wong K.L., Yeap W.H., Tai J.J.Y., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 2012; 53: 41–57.
 28. van Duin D., Allore H.G., Mohanty S., Ginter S., Newman F.K., Belshe R.B. et al. Prevacine determination of the expression of costimulatory B7 molecules in activated monocytes predicts influenza vaccine responses in young and older adults. *J Infect Dis* 2007; 195: 1590–1597.
 29. Panda A., Qian F., Mohanty S., van Duin D., Newman F.K., Zhang L. et al. Age-associated Decrease in Toll-like Receptor Function in Primary Human Dendritic Cells Predicts Influenza Vaccine Response. *J Immunol* 2010; 184: 2518–2527.
 30. Pozhariyskaya O.N., Shikov A.N., Faustova N.M., Obluchinskaya E.D., Kosman V.M., Vuorel H. et al. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from fucus vesiculosus after oral administration to rats. *Mar Drugs* 2018; 16: 132.
 31. Tokita Y., Hirayama M., Nakajima K., Tamaki K., Iha M., Nagamine T. Detection of Fucoidan in Urine after Oral Intake of Traditional Japanese Seaweed, Okinawa mozuku (*Cladosiphon okamuranus Tokida*). *J Nutr Sci Vitaminol* 2017; 63: 419–421.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Запорожец Татьяна Станиславовна — д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Крыжановский Сергей Петрович — д. м. н., учёный секретарь, Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

Персиянова Елена Викторовна — к. б. н., зав. лабораторией инновационных медико-биологических исследований и технологий, Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

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

Гажва Анна Константиновна — старший научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Шевченко Наталья Михайловна — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Звягинцева Татьяна Николаевна — д. х. н., главный научный сотрудник лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Ермакова Светлана Павловна — д. х. н., ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

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

Определение эффективности антибактериальной терапии путём проведения терапевтического лекарственного мониторинга

*А. М. КАЗАНОВА¹, М. С. ЧЕНКУРОВ¹, А. А. КОПАЙЛО¹, М. А. ИВЖИЦ^{1,2}, С. К. ЗЫРЯНОВ^{1,2}

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

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

Determination of the Effectiveness of Antibiotic Therapy by Conducting Therapeutic Drug Monitoring

*A. M. KAZANOVA¹, M. S. CHENKUROV¹, A. A. KOPAYLO¹, M. A. IVZHITS^{1,2}, S. K. ZYRYANOV^{1,2}

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow

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

На данный момент проблема антибиотикорезистентности является одной из самых актуальных. Эффективность антибактериальной терапии определяется, в том числе, и фармакокинетическими характеристиками антибактериального препарата. Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) является современным способом преодоления устойчивости возбудителей в условиях стационара, который позволяет индивидуализировать дозы препарата, особенно у сложных пациентов при повышенной резистентности возбудителей. В статье описаны два клинических случая назначения меропенема и проведения ТЛМ, что позволило индивидуализировать дозировки антибактериального препарата и обеспечить адекватную и эффективную терапию пациентам. В описанных клинических случаях предложенный режим дозирования меропенема позволил достичь целевых значений показателя % T> МПК — более 40%.

Ключевые слова: меропенем, антибактериальная терапия, терапевтический лекарственный мониторинг.

Antibiotic resistance is one of the most relevant problems nowadays. The effectiveness of antibiotic therapy is determined, among other things, by the pharmacokinetic characteristics of the antibacterial drug. Therapeutic drug monitoring (TDM) is a modern way of overcoming the resistance of pathogens found in hospitals, which allows individualizing doses of the drug, especially in complex cases with increased pathogen resistance. The article describes two clinical cases of prescribing meropenem and conducting TDM, which made it possible to individualize the dosage of the antibacterial drug and provide adequate and effective therapy to patients. In the described clinical cases, the proposed dosing regimen of meropenem allowed achieving the target values of % T> MIC — more than 40%.

Keywords: meropenem, antibiotic therapy, therapeutic drug monitoring.

Введение

Неуклонный рост антибиотикорезистентности — одна из глобальных проблем в современной медицине. Среди большого круга проблем резистентности к антибактериальным препаратам у возбудителей наиболее значимыми являются:

- метициллинорезистентность стафилококков *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*;
- полирезистентность синегнойной палочки;
- полирезистентность грамотрицательных бактерий, обусловленная образованием β -лактамаз расширенного спектра (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) [1].

По данным ВОЗ 2018 г., *K. pneumoniae* является одной из важнейших причин возникновения

больничных инфекций, таких как пневмония, сепсис, инфекции среди новорождённых и больных, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии. ВОЗ также отмечает, что в большинстве стран антибиотики группы карбапенемов оказываются неэффективными при лечении более чем 50% пациентов с инфекциями, вызванными данным возбудителем [2]. Также можно отметить и высокие показатели атрибутивной летальности, в сравнении с другими резистентными бактериями, имеющими распространённость схожую со штаммами *K. pneumoniae* [3]. Микробный анализ в отделениях ГКБ № 24 наглядно иллюстрирует высокую распространённость штаммов грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы (рис. 1).

По стратегии ВОЗ, основной путь преодоления антибиотикорезистентности — улучшение антибактериальной терапии. Так, например, антибактериальными препаратами резерва для ле-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: e-mail: Sandra0551@rambler.ru

чения инфекций, вызванных карбапенемоустойчивыми штаммами *K.pneumoniae*, являются полимиксин В, колистин, фосфомицин и тигециклин [4]. Однако в настоящее время регистрируется всё больше случаев выявления колистинорезистентных карбапенемостойких изолятов *K.pneumoniae* [5]. Начиная с 2014 г. было зарегистрировано несколько новых антибактериальных препаратов для лечения полирезистентных грамотрицательных инфекций (цефтазидим/авибактам, цефтаролин/авибактам), но назначение данных препаратов повышает затраты на лечение пациентов в стационарах [6].

Для оценки эффективности антибактериального препарата необходимо измерить его минимальную подавляющую концентрацию (МПК). Однако исследования последних лет отмечают, что взаимосвязь между МПК антибиотика в отношении возбудителя инфекции и его определённых фармакокинетических параметров позволяет достоверно предсказать эрадикацию возбудителя [7]. Карбапенемы, антибиотики бета-лактамовой группы, проявляют время-зависимую бактерицидную активность, которая характеризуется таким показателем, как время воздействия антибиотика, необходимое для гибели микроорганизма [7]. Предиктором эффективности терапии карбапенемами является соотношение времени (Т), в течение которого концентрация препарата превышает МПК, по сравнению со всем периодом между введениями препарата [8]. Этот показатель выражается в процентах ($T > \text{МПК}$, %). Для достижения максимального бактерицидного эффекта карбапенемов необходимо, чтобы этот показатель составлял более 40% [8]. По различным данным вероятность успешной эрадикации возбудителя повышается до 80–85% при $T > \text{МПК}$ 40–50% и до 100% при $T > \text{МПК}$ 60–70% [9]. Если данные целевые показатели не достигаются, эффективность терапии может снижаться, а концентрации карбапенема в крови пациентов будут находиться на уровне субоптимальных значений, что индуцирует развитие резистентности возбудителя [7]. Повышение эффективности терапии может быть достигнуто путём увеличения суточной дозы, при увеличении продолжительности инфузии, либо при увеличении частоты введения карбапенемов [10]. Основная цель терапевтического лекарственного мониторинга — подбор индивидуального дозового режима, в течение которого концентрация в плазме зависящего от времени антибиотика поддерживается выше МПК возбудителя ($T > \text{МПК}$).

В настоящее время у многих грамотрицательных возбудителей наблюдается тенденция увеличения МПК для меропенема в сторону промежуточной резистентности. Так, например, по данным EUCAST к резистентной флоре *K.pneumoniae* и *A.baumannii* относят штаммы с $\text{МПК} > 8$, однако ряд

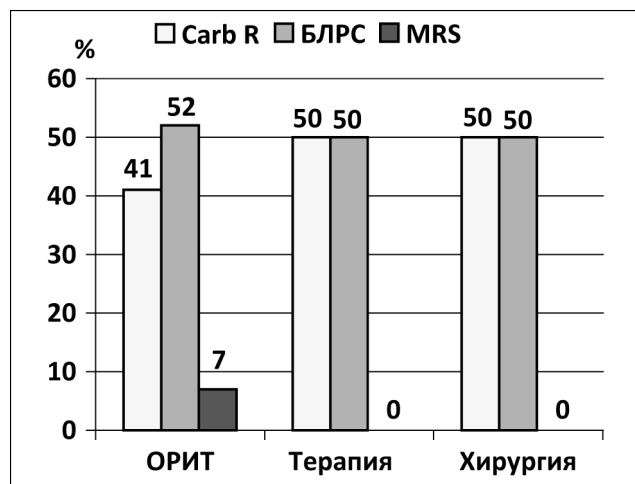


Рис. 1. Микробный анализ отделений ГKB № 24.

исследований демонстрирует более широкий разброс данного показателя от 2 до 64 мкг/мл [11, 12]. Так, например, исследование 2019 г. демонстрирует возможность эрадикации карбапенемазопро-дуцирующей *K.pneumoniae* с промежуточной резистентностью $\text{МПК} < 16$ с помощью пролонгированной инфузии меропенема [13]. Таким образом, определение распределения МПК меропенема до 64 мг/л может иметь решающее значение при назначении данного препарата пациентам. Несмотря на неутешительную тенденцию, проведение терапевтического лекарственного мониторинга позволяет преодолеть резистентность и проводить эрадикацию возбудителей меропенемом, при достижении уровня промежуточной чувствительной резистентной флоры.

Клинический случай 1

Пациент, мужчина, 37 лет, доставлен скорой помощью с жалобами на боли в верхних отделах живота, преимущественно в области левого подреберья и эпигастриальной области.

Пациент был обследован на предмет наличия изменений в лабораторных данных и органах брюшной полости. По данным исследования компьютерной томографии, наблюдалась картина острого панкреатита с мелкими очагами деструкции паренхимы головки поджелудочной железы и панкреонекроза, жидкость в сальниковой сумке, выраженная инфильтрация гепато-дуоденальной связки, брызжейки тонкой кишки, гепатоспленомегалия. По УЗИ и КТ-исследованиям, показаний к экстренной операции не было. По данным лабораторных исследований, в общем клиническом анализе крови обращали на себя внимание лейкоцитоз ($15,4 \times 10^9/\text{л}$) и повышенный гемоглобин (191 г/л). В общем клиническом анализе мочи отмечались: протеинурия (1,0 г/л), глюкозурия (112 ммоль/л) и кетонурия (9,2 ммоль/л). По результатам биохимического анализа крови,

повышена амилаза 502 ЕД/л и СРБ — 247 мг/л, немного пониженный креатинин — 46 мкмоль/л. Поставлен предположительный диагноз — острый панкреатит, который соответствовал клинике и результатам обследования. Была назначена инфузионная, антибактериальная, симптоматическая терапии, а также профилактика тромбоэмболических состояний и профилактика стресс-повреждений ЖКТ.

Инфицирование зоны поджелудочной железы и забрюшинной клетчатки при панкреонекрозе является одним из наиболее важных определяющих факторов неблагоприятного исхода у пациентов с острым воспалительным процессом в поджелудочной железе — панкреатитом [14]. При возникновении панкреатогенного сепсиса и септической полиорганной недостаточности смертность может достигать 50% [15]. Профилактическое применение антибиотиков эффективно снижает частоту септических осложнений панкреатита, следовательно, важное практическое значение наряду с хирургическими вмешательствами имеют исследования, направленные на оптимизацию антибиотикопрофилактики при панкреонекрозе [16].

В качестве антибактериальной терапии после подтверждения диагноза был назначен эртапенем в дозировке 1 г 1 раз в день. Микробиологическое исследование отделяемого брюшной полости выявило массивный рост *K.pneumonia* с промежуточной устойчивостью к меропенему ($8 \leq \text{МПК} < 16$), а также резистентностью к: Рір/Тазо (МПК > 64), цефтазидиму (МПК > 16), тобрамицину (МПК > 8), левофлоксацину (МПК > 4) и эртапенему (МПК > 4). На третий день назначения препарата отмечалось повышение температуры тела до 38°C и повышение уровня СРБ до 320 мг/л. Была проведена смена назначения эртапенема на пролонгированную инфузию меропенема в дозировке по 2 г 3 раза в сутки в течение 3 ч, в комбинации с линезолидом 1,2 г в день.

Забор образцов крови производился после 3-й дозы меропенема до начала инфузии, сразу после окончания инфузии, и через 3 ч после окончания инфузии. В результате фармакокинетического исследования путём определения меропенема в крови пациента методом ВЭЖХ установлено, что увеличенная дозировка в 2 г позволила достичь максимальной концентрации препарата в крови у пациента — 110 мг/л. Концентрация меропенема через 3 ч составила 11,5 мг/мл, минимальная концентрация — 2,4 мг/мл. Интервал дозирования каждые 8 ч и пролонгированная инфузия в течение 3 ч обеспечивали соотношение $T > \text{МПК}$ в течение 75% от интервала дозирования для *K.pneumonia* с промежуточной устойчивостью ($8 \leq \text{МПК} < 16$), и в течение 100% от интервала дозирования для чувствительных штаммов ($\text{МПК} \leq 2$), что повысило вероятность успешной эрадикации возбудителя до 100%.

В ходе мониторинга наблюдалась положительная динамика в виде изменения лабораторных показателей крови в сторону референтных значений, а именно отмечалось снижение уровня СРБ, лейкоцитов, амилазы и глюкозы (рис. 2). По

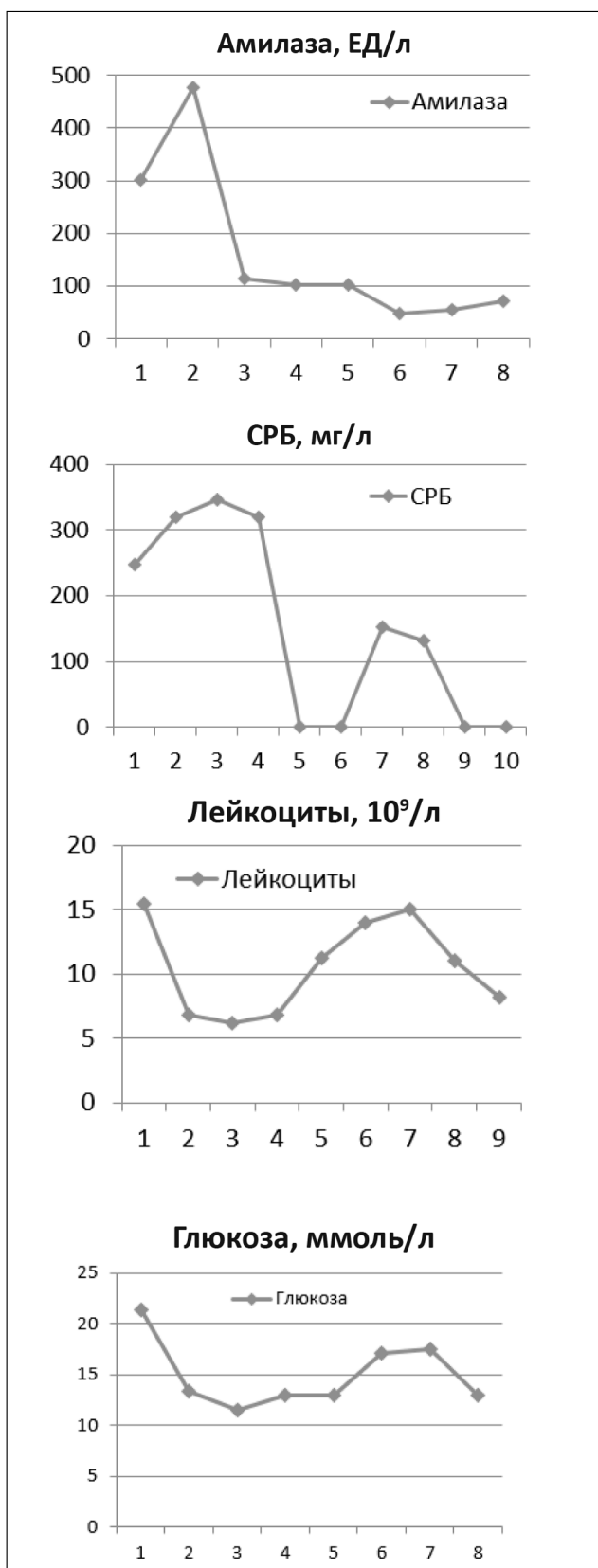


Рис. 2. Динамика лабораторных показателей крови.

итогу госпитализации, общий срок пребывания в ОРИТ составил 12 дней. Через 7 дней пациент был переведен в отделение хирургии для дальнейшего лечения и наблюдения.

Клинический случай 2

Данный клинический случай иллюстрирует возможность подбора корректных доз меропенема при почечной недостаточности. Пациентам с данным установленным заболеванием необходима коррективная антибактериальная терапия вследствие корреляции клиренса меропенема и клиренса креатинина.

Пациент, 80 лет, масса тела 110 кг, предъявляет жалобы на выраженную общую слабость, повышение температуры тела. Общее состояние тяжёлое. При общем осмотре аускультативно — дыхание жёсткое, ослабленное в нижних отделах, больше справа, умеренное количество хрипов в нижних отделах справа. По данным инструментального исследования, рентген картина соответствовала пневмонии в нижнем отделе справа. В результатах лабораторного исследования — общеклиническом и биохимическом анализах крови — обращали на себя внимание: лейкоцитоз ($18,1 \times 10^9/\text{л}$), повышение СРБ — 285 мг/л и креатинина — 424 мкмоль/л. Клиренс креатинина составил 8 мл/мин. По полученным результатам обследований был поставлен основной диагноз — госпитальная двухсторонняя полисегментная пневмония и выявлена сопутствующая патология — острая почечная недостаточность на фоне ХПН. В соответствии с диагнозом, назначена инфузионная, антибактериальная, симптоматическая, гастропротективная терапии.

Острая почечная недостаточность (ОПН) — это внезапный, в большинстве своем обратимый патологический процесс, который характеризуется нарушением всех функций обеих или единственной почки, вследствие различных экзогенных или эндогенных факторов с нарушением водно-электролитного и кислотно-основного балансов и проявляется в виде олигурии, прогрессирующей до анурии [17]. По различным данным, летальность при ОПН остаётся высокой, достигая 20% — при акушерско-гинекологических формах, 50% — при лекарственных поражениях, 70% — после травм и хирургических вмешательств и 80–100% — при полиорганной недостаточности [18]. Важным следствием почечной недостаточности является повышенный риск субоптимального достижения фармакокинетических/фармакодинамических мишеней для гидрофильных антибиотиков, таких как бета-лактамы, при применении стандартных схем приёма лекарств, что может привести к появлению резистентности [19].

В качестве антибиотикотерапии полисегментной пневмонии был назначен меропенем. В

соответствии с инструкцией, при снижении клиренса креатинина менее чем 10 мл/мин необходимо вводить препарат в дозировке равной половине от рекомендуемой суточной дозы с интервалом в 24 ч. Назначение карбапенема было выстроено следующим образом по принципу «ударных доз»: 1-е сутки — по 1 г 3 раза в день, 2-е сутки — по 1 г 2 раза в день, далее — по 1,5 г один раз в сутки.

В первые сутки фармакокинетическое исследование установило постоянное наличие меропенема в крови в высоких концентрациях и кумуляцию препарата. Минимальная концентрация составила 42 мг/л. Однако нежелательных реакций у пациента не наблюдалось. После назначения дозировки 1,5 г в сутки максимальная концентрация меропенема составила 102 мг/л, минимальная — 11 мг/л. Концентрация меропенема в крови у пациента превышала МПК штаммов возбудителей с промежуточной устойчивостью ($\text{МПК} < 8$) в течение всего интервала дозирования. Побочных эффектов также не наблюдалось. Общий срок пребывания в ОРИТ составил 2 дня. Пациент был переведён в отделение терапии, в связи с наблюдавшейся положительной динамикой, в виде сдвига показателей лейкоцитов, мочевины, креатинина, снижения дефицита фильтрации и СРБ до нормальных значений, для дальнейшего наблюдения и продолжении назначения меропенема по соответствующей схеме.

Обсуждение и выводы

На данный момент проблема антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий является одной из самых актуальных. Небольшое число эффективных антибактериальных препаратов на современном рынке ограничивает выбор решений этой проблемы. Устойчивость к антибиотикам у пациентов с инфекциями, вызванными устойчивыми бактериями, приводит к более высокому риску возникновения негативных клинических последствий и смертельного исхода, а также к увеличению продолжительности лечения в стационаре и потреблению больших медицинских ресурсов, в сравнении с пациентами, инфицированными штаммами этой же бактерии, не имеющих резистентности [2]. Терапевтический лекарственный мониторинг является современным способом преодоления резистентности возбудителей в условиях стационара, который помогает индивидуализировать дозы препарата и следить за риском возникновения побочных эффектов. Применяя современные подходы в оптимизации фармакотерапии, можно существенно повысить эффективность проводимой терапии и значительно сократить время пребывания в стационаре [20].

Меропенем, антибиотик группы карбапенемов с широким спектром действия, активен про-

тив широкого спектра грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов и обеспечивает хорошее проникновение в жидкости организма и ткани. В ходе терапевтического лекарственного мониторинга меропенема, осуществленного на базе ГКБ №24, в обоих клинических случаях можно говорить об индивидуализации терапии у сложных пациентов при повышенной резистентности возбудителей. Особенно мониторинг важен при патологических состояниях пе-

чени и почек, а также у детей и пожилых. Основным фармакодинамическим показателем для бета-лактамов является соотношение (в %) периода превышения фармакокинетической кривой значения МПК для конкретного возбудителя и периода между введениями препарата (%T>МПК) [21]. В описанных выше клинических случаях предложенный режим дозирования меропенема позволил достичь целевых значений данного показателя (более 40%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Opal S.M., Medeiros A.A., Mandell G.L., Bennet J.E., Dolin R. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. Principles and Practice of Infectious Diseases 6th. Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2004; 253–270.
2. Устойчивость к противомикробным препаратам. ВОЗ — М.: 2018. / Ustojchivost' k protivomikrobnym preparatam. VOZ, M.: 2018. [in Russian]
3. Troy Brown. Antibiotic-resistant infections doubled since 2007 in Europe. Lancet. published online november 5, 2018. Available from: URL: <https://www.medscape.com/viewarticle/904640>.
4. Hsu A.J., Tamma A.J. Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections in Children. Clinical Infection Disease 2014; 58: 10: 1439–1448.
5. Крыжановская О.А. Чувствительность к антибиотикам и механизмы устойчивости к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Дис. канд. мед. наук. ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава РФ, М.: 2016. / Kryzhanovskaya O.A. Chuvstvitel'nost' k antibiotikam i mekhanizmy ustojchivosti k karbapenemam *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*, vydelennykh u detej v otdeleniyakh reanimatsii i intensivnoj terapii. Dis.kand.med.nauk. FGBU «Nauchnyj tsentr zdorov'ya detej» Minzdrava RF, M.: 2016. [in Russian]
6. Программа SKAT (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации. Под ред. С. В. Яковлева, Н. И. Брико, С. В. Сидоренко, Д. Н. Проценко. М.: Издательство «Перо», 2018. — 156 с. / Programma SKAT (Strategiya Kontrolya Antimikrobnaj Terapii) pri okazanii stacionarnoj meditsinskoj pomoshchi: Rossijskie klinicheskie rekomendatsii. Pod red. S. V. Yakovleva, N. I. Briko, S. V. Sidorenko, D. N. Protsenko. M.: Izdatel'stvo «Pero», 2018; 156. [in Russian]
7. Зырянов С.К., Козлов Р.С., Макушкин Б.Б. Новый взгляд на известные антибиотики: как правильно использовать фармакодинамические параметры. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2016. — № 2. — С. 125–129. / Zyryanov S.K., Kozlov R.S., Makushkin B.B. Novyj vzglyad na izvestnye antibiotiki: kak pravil'no ispol'zovat' farmakodinamicheskie parametry. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2016; 2: 125–129. [in Russian]
8. Штейнберг Л.Л., Упницкий А.А., Белоусов Ю.Б. Особенности применения карбапенемов в лечении нозокомиальной пневмонии. Лечебное дело. — 2014. — 1. / Shteinberg L.L., Upnitskij A.A., Belousov Ju.B. Osobennosti primeneniya karbapenemov v lechenii nozokomial'noj pnevmonii. Lechebnoe deloju 2014; 1. [in Russian]
9. Sunada M., Kinoshita D., Furukawa N., Kihara M., Hishimura A., Moriuchi M. et al. Therapeutic drug monitoring of meropenem in neonate with necrotizing enterocolitis: a challenge. BMC Pediatrics 2016; 16: 141.
10. Белобородов В.Б. Клиническое значение оптимизации фармакокинетики и фармакодинамики меропенема. РМЖ. — 2006. — № 4. — С. 311. / Beloborodov V.B. Klinicheskoe znachenie optimizatsii farmakokinetiki i farmakodinamiki meropenema. RMZh 2006; 4: 311. [in Russian]
11. Catharine C. Bulik, Kathy A. Fauntleroy, Stephen G. Jenkins, Mayssa Abuali, Vincent J. LaBombardi, David P. Nicolau et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. J Clin Microbiol 2010 Jul; 48 (7): 2402–2406. Published online 2010 May 19.
12. Nowak J., Zander E., Stefanik D., Higgins P.G., Roca I., Vila J. et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. J Antimicrob Chemother 2017 Dec; 72 (12): 3277–3282. Published online 2017 Sep 8.
13. Cojutti P., Sartor A., Bassetti M., Scarpato C., Pea F. Is meropenem MIC increase against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* correlated with increased resistance rates against other antimicrobials with Gram-negative activity? J Global Antimicrob Resist September 2018; 14: 238–241.
14. Manes G., Rabitti P.G. et al. Меропенем по сравнению с имипенемом в профилактике септических осложнений при остром панкреатите: рандомизированное, контролируемое исследование. Pancreas 2003; 27: 4: 79–83. / Manes G., Rabitti P.G. et al. Meropenem po sravneniyu s imipenemom v profilaktike septicheskikh oslozhnenij pri ostrom pankreatite: randomizirovannoe, kontrolirovannoe issledovanie. Pancreas 2003; 27: 4: 79–83.
15. Куделич О.А., Кондратенко Г.Г., Пучков А.Ф. Характер и особенности осложнений тяжелого острого панкреатита по результатам патоморфологических исследований. Новости хирургии. — 2014. — Т. 22. — № 3. / Kudelich O.A., Kondratenko G.G., Puchkov A.F. Kharakter i osobennosti oslozhnenij tyazhelogo ostrogo pankreatita po rezul'tatam patomorfologicheskikh issledovanij. Novosti khirurgii 2014; 22: 3. [in Russian]
16. Савельев В.В. Усовершенствование диагностической и лечебной тактики при панкреонекрозе с использованием методов физико-химической биологии: дисс. док. мед. наук. ФГАОУ ВО «Северо-восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», Якутск, 2016. / Savel'ev V.V. Usovshenstvovanie diagnosticheskoy i lechebnoj taktiki pri pankronekroze s ispol'zovaniem metodov fiziko-khimicheskoy biologii: diss. dok. med. nauk. FGAOUVO «Severo-vostochnyj federal'nyj universitet imeni M.k. Ammosova», Yakutsk, 2016. [in Russian]
17. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острой почечной недостаточности. Под ред. Ю.Аляев, П.В.Глыбочко, Д.Ю.Пушкар М.: XIV конгресс Российского общества урологов, 2014. / Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu ostroj pochechnoj nedostatochnosti. Pod red. Ju.Alyayev, P.V.Glybochko, D.Jyu.Pushkar M.: XIV kongress Rossijskogo obshchestva urologov, 2014. [in Russian]
18. Милованов Ю.С., Николаев А.Ю. Острая почечная недостаточность. РМЖ. — 1998, № 19. / Milovanov Ju.S., Nikolaev A.Jyu. Ostraya pochechnaya nedostatochnost'. RMZh. — 1998, № 19.
19. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. М.: НИИХ СГМА, 2007. / Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoj khimioterapii. Pod red. L.S. Strachunskogo, Ju.B. Belousova, S.N. Kozlova. M.: NIIKh SGMA, 2007. [in Russian]
20. Соколов А.В. Терапевтический лекарственный мониторинг. Качественная клиническая практика. — 2002. — № 1. — С. 78–88. / Sokolov A.V. Terapevticheskij lekarstvennyj monitoring. Kachestvennaya klinicheskaya praktika 2002; 1: 78–88. [in Russian]
21. Белобородов В.Б. Клиническое значение оптимизации фармакокинетики и фармакодинамики меропенема. РМЖ. — 2006. — № 4. — С. 311. / Beloborodov V.B. Klinicheskoe znachenie optimizatsii farmakokinetiki i farmakodinamiki meropenema. RMZh 2006; 4: 311. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Казанова Александра Михайловна — аспирантка кафедры общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО РУДН, Москва. ORCID ID: 0000-0003-2324-0069, SPIN-код: 6277-6484

Ченкуров Михаил Станиславович — аспирант кафедры общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО РУДН, Москва. ORCID.ID: 0000-0002-8739-2363, SPIN — код: 5420-4938

Копайло Арина Александровна — врач-клинический ординатор 2 года обучения кафедры общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО РУДН, Москва

Ивжиц Марина Александровна — заведующая отделом клинической фармакологии, врач-клинический фармаколог, ГБУЗ «ГКБ №24 ДЗМ г. Москвы», ассистент кафедры клинической и общей фармакологии РУДН Москва. ORCID.ID: 0000-0002-0331-4916, SPIN-код: 5425-5380

Зырянов Сергей Кенсаринович — д. м. н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО РУДН, Москва. ORCID ID: 0000-0002-6348-6867, SPIN-код: 2725-9981

Прокальцитониновый тест в практике ревматолога

Н. В. МУРАВЬЕВА, *Б. С. БЕЛОВ, Г. М. ТАРАСОВА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва

Procalcitonin Test in Rheumatologist's Practice

N. V. MURAVYEVA, *B. S. BELOV, G. M. TARASOVA

V. A. Nasonova Scientific Research Institute of Rheumatology, Moscow

Цель. Оценить диагностическую значимость прокальцитонинового теста (ПКТ) в практике ревматолога. **Материал и методы.** В исследование включено 360 больных различными иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (ИВРЗ). Концентрацию ПКТ в сыворотке крови определяли количественным электрохемилюминесцентным методом на анализаторе Cobas E 411 (Roche, Швейцария). **Результаты.** У больных без инфекции ($n=191$) медиана (Ме) уровня ПКТ составила 0,11 нг/мл [0,05; 0,16]. У больных с генерализованной инфекцией ($n=11$) Ме уровня ПКТ составила 3,6 нг/мл [0,88; 11,3]. При тяжёлой локальной инфекции ($n=75$) Ме ПКТ составила 0,45 нг/мл [0,24; 1,2], при лёгкой ($n=83$) — 0,12 нг/мл [0,05; 0,17]. По данным ROC-анализа, диагностическая значимость определения ПКТ при генерализованной инфекции отличная, при тяжёлой локальной инфекции — очень хорошая, при дифференциации генерализованной инфекции от локальной — очень хорошая. **Заключение.** ПКТ является ценным диагностическим тестом, способствующим распознаванию генерализованных и тяжёлых локальных инфекций у больных ИВРЗ. Однако при интерпретации значений ПКТ следует учитывать совокупность данных: конкретную ревматическую нозологию, результаты клинико-лабораторного и инструментального обследований.

Ключевые слова: иммуновоспалительные ревматические заболевания, генерализованные инфекции, локальные инфекции, прокальцитониновый тест.

The aim of the work is to evaluate the diagnostic significance of the procalcitonin test (PCT) in the practice of a rheumatologist. **Material and methods.** The study included 360 patients with various immuno-inflammatory rheumatic diseases (IIRD). Serum PCT concentration was determined by a quantitative electrochemiluminescent method on a Cobas E 411 analyzer (Roche, Switzerland). **Results.** The median (Me) level of PCT was 0.11 ng/ml [0.05; 0.16] in patients without infection ($n=191$). In patients with generalized infection ($n=11$), the Me level of PCT was 3.6 ng/ml [0.88; 11.3]. In cases of severe local infection ($n=75$), the Me level of PCT was 0.45 ng/ml [0.24; 1.2], while in case of mild local infection ($n=83$) — 0.12 ng/ml [0.05; 0.17]. ROC curve analysis showed that the diagnostic significance of determining PCT for generalized infection is very high, for severe local infection it is high, and for differentiation of generalized infection from local infection it is high. **Conclusion.** PCT is a valuable diagnostic test that helps recognize generalized and severe local infections in patients with IIRD. However, when interpreting the values of PCT, the totality of data should be taken into account: specific rheumatic nosology, results of clinical laboratory, and instrumental examinations.

Keywords: immuno-inflammatory rheumatic diseases, generalized infections, local infections, procalcitonin test.

Введение

В современной клинической практике прокальцитониновый тест (ПКТ) нашёл широкое применение в диагностике сепсиса, тяжёлых бактериальных инфекций, дифференциальной диагностике лихорадки неясного генеза, оценке эффективности лечения и прогноза при тяжёлых инфекциях, а также в качестве косвенного показателя к назначению антибиотикотерапии при пневмонии, остром панкреатите и ряде других системных инфекций [1–4].

Предшественник гормона кальцитонина — ПКТ — представляет собой белок длиной 116

аминокислот с молекулярной массой 13 кДа, в норме синтезируется только С-клетками щитовидной железы и обнаруживается в крови в следовых количествах [5]. При бактериальных инфекциях, воздействии токсинов и особенно при септических состояниях увеличивается синтез ПКТ клетками печени, почек, лёгких, мышечной ткани, адипоцитами, макрофагами и моноцитами. В качестве основного индуктора синтеза ПКТ рассматриваются липополисахарид бактериальной стенки и фактор некроза опухоли- α , и, кроме того, ряд интерлейкинов (ИЛ), включая ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6 [6]. Показано, что нейтрализующие антитела к ПКТ улучшают выживаемость на экспериментальных моделях сепсиса, что позволяет отнести эту молекулу к провоспалительным медиаторам [7].

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А. НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой

Преимуществом определения ПКТ является то, что его синтез при системном воспалительном ответе нарастает в течение первых 2–4 ч и достигает максимума через 12 ч, т. е. раньше по сравнению с другими белками острой фазы [8]. Стабильность этого белка, устойчивость к средним и низким температурам, постоянство присутствия в плазме в течение 24 ч, простота методики позволяют рекомендовать его определение в рутинных условиях. Применение антимикробных препаратов, анальгетиков, антикоагулянтов, диуретиков, вазоактивных средств не влияет на концентрацию ПКТ [9]. В отличие от других маркеров инфекций, в частности неоптерина, нарушение функции почек мало влияет на период полувыведения ПКТ [10].

Проблема коморбидных инфекций в ревматологии по-прежнему остаётся актуальной. При этом дифференциальная диагностика между активностью иммуновоспалительного ревматического заболевания (ИВРЗ) и развитием инфекционного процесса нередко является крайне сложной из-за сходства клинических и лабораторных проявлений. Учитывая изложенное выше, можно предполагать, что определение уровня ПКТ будет способствовать своевременному распознаванию инфекций у больных ИВРЗ. Однако работы, посвящённые диагностической информативности ПКТ в ревматологии, в достаточной степени противоречивы [11]. Цель исследования — оценить значимость ПКТ в качестве биомаркера инфекций у больных ИВРЗ.

Материал и методы

В ходе ретроспективного исследования изучены истории болезни и амбулаторные карты 360 пациентов, находившихся под наблюдением в ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой, с различными ИВРЗ: системной красной волчанкой (СКВ) — 76, ревматоидным артритом (РА) — 75, ювенильным артритом (ЮА) — 60, системным васкулитом (СВ) — 35, системной склеродермией (ССД) — 30, анкилозирующим спондилитом (АС) — 18, болезнью Стилла взрослых (БСВ) — 13, другими ИВРЗ — 53.

Концентрацию ПКТ в сыворотке крови определяли количественным электрохемилюминесцентным методом на анализаторе Cobas E 411 (Roche, Швейцария). За верхнюю границу нормы принимали концентрацию равную 0,05 нг/мл.

Статистическую обработку материала проводили с использованием пакета программ Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. С целью оп-

ределения диагностической значимости определения ПКТ выполняли оценку чувствительности и специфичности, а также построение характеристических ROC-кривых с анализом площади под ними (AUC). При величине AUC 0,9–1,0 значимость теста оценивали как отличную, 0,8–0,9 — очень хорошую, 0,7–0,8 — хорошую, 0,6–0,7 — среднюю, <0,6 — плохую.

Результаты

У больных без инфекции ($n=191$) медиана (Ме) ПКТ составила 0,11 нг/мл [0,05; 0,16]. У 85% пациентов уровень ПКТ не превышал 0,25 нг/мл. При этом 45% значений ПКТ были ниже 0,1 нг/мл, что свидетельствует об отсутствии бактериальной инфекции (табл. 1).

Следует подчеркнуть, что в группе больных без инфекции наиболее высокие значения ПКТ выявлены при БСВ — 0,39 нг/мл [0,14; 0,51], системной форме ЮА — 0,17 нг/мл [0,12; 0,5] и СКВ — 0,11 нг/мл [0,06; 0,15]. В то же время при РА, СВ, ССД, АС Ме ПКТ составила 0,07 нг/мл [0,03; 0,12].

Инфекционный процесс был выявлен у 169 больных ИВРЗ, у 11 из них диагностирована генерализованная инфекция, у 158 — локальная. В зависимости от выраженности интоксикационного синдрома локальные инфекции разделены на тяжёлые ($n=75$) и лёгкие ($n=83$). Наиболее частыми локализациями инфекционного процесса были нижние дыхательные пути ($n=48$), кожа, мягкие ткани и слизистые оболочки ($n=40$), мочевыделительная система ($n=29$) (табл. 2).

Группа больных с генерализованной инфекцией включала 11 человек. У 5 пациентов инфекционный процесс развивался на фоне СКВ, у остальных — на фоне РА, СВ, болезни Шегрена, смешанного заболевания соединительной ткани, остеоартроза, ЮА (по одному случаю каждый). Ме ПКТ составила в этой группе 3,6 нг/мл [25-й; 75-й перцентили, соответственно, 0,88; 11,3]. У 8 больных этой группы значения ПКТ превысили 2 нг/мл, у 3–10 нг/мл, что соответствует высокой вероятности бактериальной инфекции или тяжёлого сепсиса.

У больных с локальной инфекцией ($n=158$) Ме ПКТ составила 0,16 нг/мл [0,08; 0,38]. У 96% пациентов этой группы значения ПКТ не превышали 2 нг/мл, у 80% — 0,5 нг/мл.

Таблица 1. Рекомендации по клинической интерпретации результатов определения уровня ПКТ в сыворотке крови [12]

Уровень ПКТ, нг/мл	Интерпретация
0,05 (0,1)	Здоровые люди. Бактериальная инфекция отсутствует
0,1–0,25	Вероятность бактериальной инфекции очень мала Вероятность системной бактериальной инфекции практически отсутствует
0,25–0,5	Возможна локальная бактериальная инфекция Вероятность системной бактериальной инфекции очень мала
0,5–2,0	Высокая вероятность бактериальной инфекции. Возможна системная бактериальная инфекция Рекомендуются повторные определения ПКТ через 6–24 ч
2,0–10,0	Высокая вероятность системной бактериальной инфекции. Возможен тяжёлый сепсис Рекомендуется ежедневный контроль уровня ПКТ
>10,0	Высокая вероятность тяжёлого сепсиса. Рекомендуется ежедневный контроль уровня ПКТ

Таблица 2. Структура инфекций у больных ИВРЗ (n=169)

Инфекционные заболевания	Число больных
Генерализованная инфекция:	11
Сепсис	9
Инфекционный эндокардит	2
Локальная инфекция:	158
Тяжёлая	75
Лёгкая	83
Поражение дыхательных путей и ЛОР-органов:	60
— полисегментарная пневмония	21
— очаговая пневмония	12
— острый бронхит	8
— синусит	6
— острый фарингит	5
— туберкулез лёгких	4
— гнойный бронхит	3
— острый гнойный отит	1
Поражение кожи, мягких тканей и слизистых оболочек:	40
— инфицированные трофические язвы, пролежни	12
— абсцесс/флегмона	9
— герпетическая инфекция	7
— кандидоз	6
— панариции/паронихии	4
— гангрена пальцев	2
Инфекция мочевыводящих путей	29
Инфекционный артрит/остеомиелит	17
Поражение ЖКТ	6
ОРВИ	5
Активный вирусный гепатит С	1

При тяжёлой локальной инфекции ($n=75$) Ме ПКТ составила 0,45 нг/мл [0,24; 1,2]. У 74% пациентов этой группы уровень ПКТ был выше 0,25 нг/мл. При этом 31% значений ПКТ находилось в интервале 0,25–0,5 нг/мл, что свидетельствует о возможном наличии локальной бактериальной инфекции. В то же время 29% значений ПКТ находилось в интервале 0,5–2,0 нг/мл, что соответствует высокой вероятности бактериальной инфекции и возможному наличию системной инфекции. У 5 пациентов этой группы уровень ПКТ превышал 2 нг/мл, причём у двух из них он был выше 10 нг/мл, что свидетельствует о высокой вероятности тяжёлого сепсиса. Эти больные имели тяжёлую инфекцию без генерализации процесса.

При лёгкой локальной инфекции ($n=83$) Ме ПКТ составила 0,12 нг/мл [0,05; 0,17]. При этом 47% значений ПКТ находилось в интервале 0,1–0,25 нг/мл, что соответствует низкой вероятности бактериальной инфекции. Только в трёх случаях лёгкой локальной инфекции отмечено повышение ПКТ более 0,5 нг/мл — при БСВ, системной форме ЮА и СКВ.

При генерализованной инфекции уровень ПКТ был значимо выше, чем у пациентов без инфекции ($p<0,0001$), а также с лёгкой ($p<0,0001$) и тяжёлой ($p<0,0001$) локальной инфекцией. При локальной инфекции в целом уровень ПКТ был выше, чем в группе больных без инфекции ($p=0,01$). У больных с тяжёлой локальной инфекцией уровень ПКТ был выше по сравнению с па-

циентами без инфекции ($p<0,001$) и с лёгкой локальной инфекцией ($p=0,004$). Достоверных различий ПКТ в группах больных с лёгкой локальной инфекцией и без инфекции не выявлено.

Мы проанализировали традиционные лабораторные острофазовые воспалительные показатели в исследуемых группах больных. Оказалось, что у больных с генерализованной инфекцией СОЭ и СРБ были достоверно выше, чем у пациентов без инфекции и с лёгкой (но не тяжёлой) локальной инфекцией ($p<0,01$ для обеих групп по СОЭ, $p<0,001$ для обеих групп по СРБ). Сходные данные получены в отношении СОЭ и СРБ при сравнении их у пациентов с тяжёлой локальной инфекцией и без инфекции ($p<0,01$ для обеих групп по СОЭ и СРБ), а также у больных с тяжёлой и лёгкой локальной инфекцией ($p<0,01$ для обеих групп по СОЭ и СРБ). Напротив, не было выявлено статистически значимых различий СОЭ и СРБ у пациентов с лёгкой локальной инфекцией и без инфекции. Более того, ни в одной из исследуемых групп не обнаружены достоверные различия в уровне лейкоцитов.

По данным ROC-анализа, диагностическая значимость определения ПКТ при генерализованной инфекции отличная, при тяжёлой локальной инфекции — очень хорошая, при дифференциации генерализованной инфекции от локальной — очень хорошая (рис. 1–3).

Обсуждение

Дифференциальная диагностика активного ревматического процесса и инфекционных осложнений нередко вызывает большие затруднения, что диктует потребность в поиске биомар-

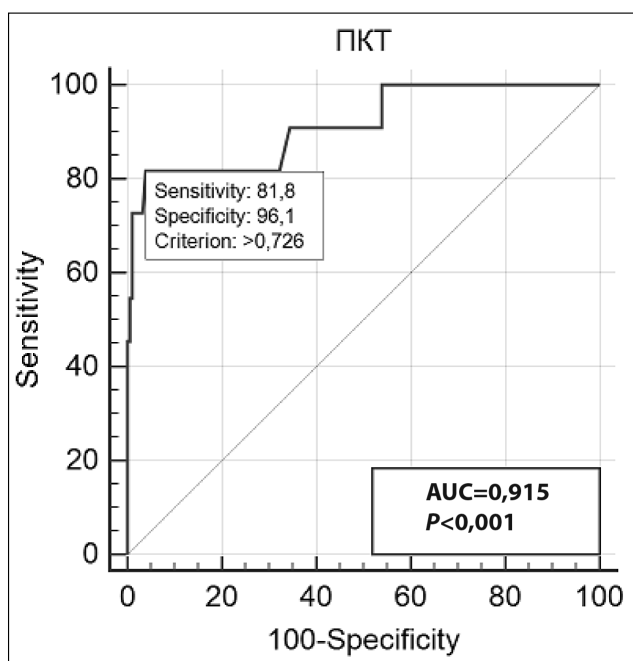


Рис. 1. Генерализованная инфекция.

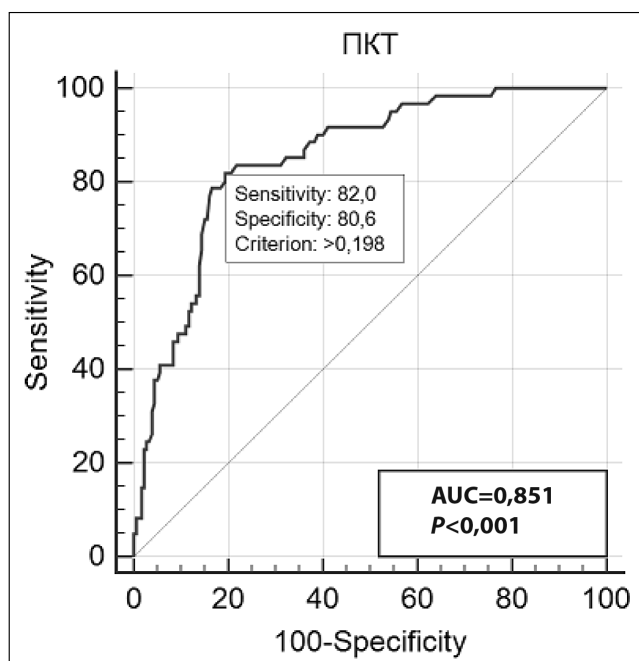


Рис. 2. Тяжёлая локальная инфекция.

кера, обладающего достаточной чувствительностью и специфичностью в выявлении инфекций. Среди таких маркеров несомненный интерес представляет ПКТ.

Наиболее высокие значения ПКТ (выше 2 нг/мл) наблюдаются при системных бактериальных, паразитарных и грибковых инфекциях. При тяжёлых вирусных инфекциях, воспалительных заболеваниях неинфекционного генеза, а также при локальных бактериальных инфекциях уровень ПКТ соответствует нормальным значениям (до 0,1 нг/мл) или незначительно увеличивается до 0,3–1,5 нг/мл [13]. Метаанализ 9 исследований, посвящённых оценке клинического значения ПКТ при аутоиммунных заболеваниях, демонстрирует высокую информационную ценность ПКТ — AUC 0,91, чувствительность 75,0, специфичность 90,0 [14].

Результаты нашего исследования согласуются с этими данными: при генерализованных инфекциях уровень ПКТ значительно повышался у 73% больных, при локальных инфекциях у 80% — не превышал 0,5 нг/мл, при отсутствии инфекции у 85% — был ниже 0,25 нг/мл, а в 45% случаях — ниже 0,1 нг/мл; диагностическая значимость ПКТ при генерализованной инфекции оценена как отличная, при тяжёлой локальной инфекции — очень хорошая, при дифференциации генерализованной инфекции от локальной — очень хорошая. Мы полагаем, что значение ПКТ 2,0 нг/мл может быть предложено в качестве порогового при диагностике генерализованной инфекции у больных ИВРЗ, 0,25 нг/мл — для диагностики локальной инфекции тяжёлого течения. Однако результаты ПКТ обязательно следует рассматривать

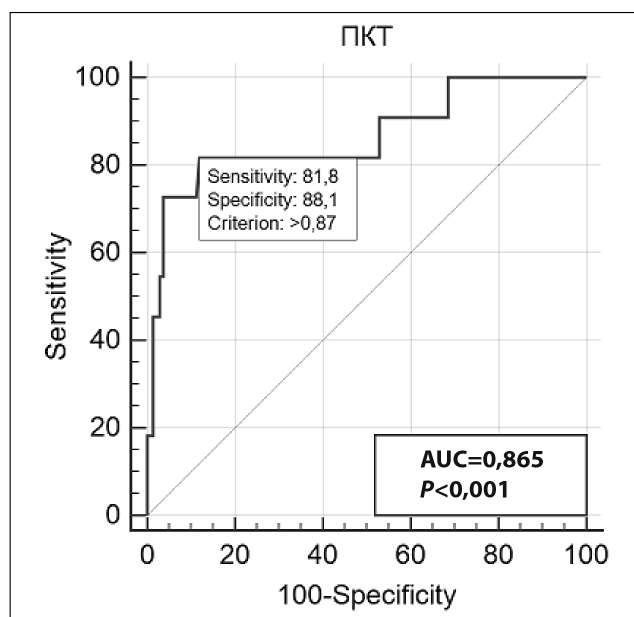


Рис. 3. Дифференциация генерализованной инфекции от локальной инфекции.

в контексте имеющегося клинического симптомокомплекса и результатов клинико-лабораторного и инструментального обследований.

Особого внимания заслуживает вопрос о значимости пороговых показателей ПКТ при ИВРЗ. Высокий уровень ПКТ при отсутствии инфекции описан при гранулематозе с полиангиитом (Вегенера), болезни Kawasaki, синдроме Стилла взрослых и других [15–17]. V. Schwenger и соавт. [18] предлагают повысить пороговое значение ПКТ до 1 нг/мл для диагностики тяжёлых системных инфекций при ANCA-ассоциированных васкулитах. По данным японских авторов, уровень ПКТ ≥ 1 нг/мл имеет более высокую специфичность для распознавания сепсиса и приемлем для дифференциальной диагностики системных бактериальных инфекций и воспалительных ИВРЗ [19]. D. Y. Chen и соавт. [20] полагают, что значение ПКТ, составляющее 1,4 нг/мл, может считаться пороговым при БСВ. Отечественные исследователи также делают заключение о возможности применения разных пороговых значений ПКТ у различных групп пациентов [21].

В нашем исследовании у пациентов с активными ИВРЗ без инфекции уровень ПКТ составил 0,11 нг/мл [0,05; 0,16]. Однако при БСВ, системной форме ЮА и СКВ значения были выше, чем при других ИВРЗ. Данный факт следует учитывать при проведении дифференциальной диагностики.

Таким образом, определение ПКТ является ценным диагностическим тестом, позволяющим распознавать генерализованные и тяжёлые локальные инфекции у больных ИВРЗ. Перспективным направлением в диагностике инфекций

при ИВРЗ можно считать мультимаркерный подход, который позволит нивелировать отрицательные характеристики отдельных параметров и повысить их значимость в распознавании инфекций у больных ИВРЗ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ромашева М.Л., Прошин Д.Г. Диагностика сепсиса у больных в критических состояниях. Общая реаниматология. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 34–36 / Romasheva M.L., Proshin D.G. Diagnosis of sepsis in critically ill patients. Obschay Reanimatologia 2007; 3 (4): 34–36 [in Russian]
2. Schuetz P., Chiappa V., Briel V., Greenwald J.L. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms. Arch Intern Med 2011; 171 (15): 1322–1331.
3. Uzzan B., Cohen R., Nicolas P. et al. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. Crit. Care Med 2006; 34 (7): 1996–2003.
4. Лобань Н.В., Федотова Н.Ю., Лысенко А.С. Опыт применения количественного теста на прокальцитонин для оценки эффективности антибактериальной терапии у детей первого года жизни. Вопросы диагностики в педиатрии. — 2009. — Т. 1. № 1. — С. 37–40. / Loban N.V., Fedotova N.Yu., Lysenko A.S. Experience in using a quantitative procalcitonin test to assess the effectiveness of antibiotic therapy in infants. Vopr Diagn Pediatr 2009; 1 (1): 37–40 [in Russian]
5. Becker K.L., Nylen E.S., White J.C. et al. Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89 (4): 1512–1525.
6. Dahaba A.A., Metzler H. Procalcitonin's role in the sepsis cascade. Is procalcitonin a sepsis marker or mediator? Minerva Anestesiol 2009; 75 (7–8): 447–452.
7. Tavares E., Minano F.J. Immunoneutralization of the aminoprocacalcitonin peptide of procalcitonin protects rats from lethal endotoxaemia: neuroendocrine and systemic studies. Clin Sci. 2010; 119 (12): 519–534. doi: 10.1042/CS20100007
8. Muller B., Christ-Crain M., Nylen E. et al. Limits to the use of the procalcitonin level as a diagnostic marker. Clin Infect Dis 2004; 39 (12): 1867–1868.
9. Meisner M. Procalcitonin. A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York. 2000; 162–175.
10. Meisner M., Schmidt J., Huttner H., Tschaiakowsky K. The natural elimination rate of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. Intensive Care Med 2000; 26: 212–216.
11. Shaikh M.M., Hermans L.E., van Laar J.M. Is serum procalcitonin measurement a useful addition to a rheumatologist's repertoire? A review of its

Настоящая статья подготовлена в рамках НИР по теме «Коморбидные инфекции при ревматических заболеваниях и проблемы безопасности антиревматической терапии» (AAAA-A19-119021190148-3, 0514-2019-0005).

- diagnostic role in systemic inflammatory diseases and joint infections. Rheumatology (Oxford) 2015; 54 (2): 231–240. doi: 10.1093/rheumatology/keu416
12. Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. Clin Chim Acta 2002; 323 (1–2): 17–29. doi: 10.1016/S0009-9881(02)00101-8
 13. Вельков В.В. Прокальцитонин и С-реактивный белок в современной лабораторной диагностике. Клинико-лабораторный консилиум. — 2008. — т. 25. — № 6. — С. 46–52 / Vel'kov V.V. Procalcitonin and C-reactive protein in modern laboratory diagnostics. Clinical laboratory Council of physicians 2008; 25 (6): 46–52. [in Russian].
 14. Wu J.-Y., Shen C.-J., Hsieh Y.-C. et al. Use of serum procalcitonin to direct bacterial infection in patients with autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. Arthritis Rheum 2012; 64 (9): 3034–3042. doi: 10.1002/art.34512
 15. Moosig F., Csernok E., Reinhold-Keller E. et al. Elevated procalcitonin levels in active Wegener's granulomatosis. J Rheumatol 1998; 25 (8): 1531–1533.
 16. Okada Y., Minakami H., Tomomasa T. et al. Serum procalcitonin concentration infection in patients with Kawasaki disease. J Infect 2004; 48 (2): 199–205. doi: 10.1016/j.jinf.2003.08.002
 17. Scire C.A., Cavagna L., Perotti C. et al. Diagnostic value of procalcitonin measurement in febrile patients with systemic autoimmune diseases. Clin Exp Rheumatol 2006; 24 (2): 123–128.
 18. Schwenger V., Sis J., Breitbart A., Andrassy K. CRP levels in autoimmune disease can be specified by measurement of procalcitonin. Infection. 1998; 26 (5): 274–276. doi: 10.1007/BF02962246
 19. Tamaki K., Kogata Y., Sugiyama D. et al. Diagnostic accuracy of serum procalcitonin concentrations for detecting systemic bacterial infection in patients with systemic autoimmune diseases. J Rheumatol 2008; 35 (1): 114–119.
 20. Chen D.Y., Chen Y.M., Ho W.L. et al. Diagnostic value of procalcitonin for differentiation between bacterial infection and non-infection inflammation in febrile patients with active adult-onset Still's disease. Ann Rheum Dis 2009; 68 (6): 1074–1075. doi: 10.1136/ard.2008.098335
 21. Лапин С.В., Маслянский А.Л., Лазарева Н.М. и др. Значение количественного определения прокальцитонина для диагностики септических осложнений у больных аутоиммунными ревматическими заболеваниями. Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 1. — С. 28–33. / Lapin S.V., Maslyanskiy A.L., Lazareva N.M., et al. The value of quantitative analysis of procalcitonin in diagnostics of septic complications in patients with systemic autoimmune diseases. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika 2013; 1: 28–33. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Муравьева Наталья Валерьевна — к.м.н., научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва

Белов Борис Сергеевич — д.м.н., заведующий лабораторией коморбидных инфекций и мониторинга безопасности

лекарственной терапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва

Тарасова Галина Михайловна — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва

Антибактериальная терапия туляремии: современное состояние и перспективы

*И. А. ЩИПЕЛЕВА, Е. И. МАРКОВСКАЯ, О. Ф. КРЕТЕНЧУК

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Antibacterial Therapy of Tularemia: Current Status and Prospects

*I. A. SHCHIPELEVA, E. I. MARKOVSKAYA, O. F. KRETENCHUK

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don

Обзорная статья включает обобщённые данные литературы об экспериментальной оценке восприимчивости *Francisella tularensis* к существующим антибиотикам и их эффективности при лечении туляремии человека. Представлены данные о способах повышения эффективности некоторых антибактериальных препаратов, проявляющих сниженную активность при терапии туляремийной инфекции. Обозначен спектр исследований, направленных на создание современных более результативных антибиотиков, обладающих новыми механизмами действия. Описаны некоторые способы модификации вариантов уже известных групп антибактериальных препаратов, а также способы предотвращения или замедления формирования антибиотикорезистентности у *F.tularensis*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, туляремия, антибиотики, лечение, резистентность.

The review article includes summarized literature data on experimental evaluation of *Francisella tularensis* susceptibility to existing antibiotics, and their effectiveness in treatment of tularemia in humans population. The data on ways to improve the effectiveness of some antibacterial drugs that show reduced activity in treatment of tularemia infection are presented. The range of studies aimed at creating modern and more effective antibiotics with new mechanisms of action is defined. A number of methods for modifying variants of the already known groups of antibacterial drugs, as well as ways of prevention or limitation of antibiotic resistance formation in *F.tularensis* are described.

Keywords: *Francisella tularensis*, tularemia, antibiotics, treatment, resistance.

Крупные вспышки и спорадические случаи туляремии, относящейся к природно-очаговым особо опасным инфекционным болезням, периодически регистрируются во многих странах мира, в том числе и в России. Природные очаги туляремии распространены на большей части территории Российской Федерации.

Туляремия продолжает оставаться важной проблемой в системе обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения: так, диагноз туляремии с 2009 по 2018 гг. был зарегистрирован в России у 1944 человек; 1005 из этих случаев произошли в Ханты-Мансийском автономном округе во время эпидемической вспышки в 2013 г.; в 2018 г. в стране зарегистрирован 71 случай инфицирования человека возбудителем туляремии [1].

Francisella tularensis — смертельно опасный патоген, отнесённый к потенциальным агентам биотерроризма [2–5].

Наибольшая патогенность для человека связана с *F.tularensis* подвида *tularensis* (*nearctica*), ко-

торый способен вызывать тяжёлые формы болезни с летальностью до 6% [6].

Усугубляет ситуацию тот факт, что штаммы *F.tularensis* имеют ограниченный спектр чувствительности к антибиотикам из-за природной устойчивости к пенициллинам, цефалоспорином, макролидам, клиндамицину и полимиксину [6–8]. Также установлена зависимость эффективности лечения не только от использованного препарата, но и от штамма возбудителя, выявлена возможность формирования персистирующей устойчивости возбудителя в макроорганизме на фоне интенсивного курса антибактериальной терапии [9], что повышает риск возникновения рецидивов инфекции.

Цель обзора — обобщение данных литературы об экспериментальной чувствительности *F.tularensis* к антибиотикам и эффективности различных антибактериальных препаратов при лечении туляремии человека.

На протяжении десятилетий стрептомицин считался препаратом выбора, несмотря на возможные побочные эффекты и ото-, и нефротоксичность, в частности.

Аминогликозиды до настоящего времени считаются наиболее надёжным средством лечения

тяжёлых случаев туляремии (например, лёгочной и других системных форм), что обосновано целым рядом исследований разных лет [10–12]. Показана перспективность использования амикацина при экспериментальной туляремийной инфекции белых мышей, обусловленной устойчивым к стрептомицину вариантом *F.tularensis* Schu [13].

Однако в работе Н. В. Павлович и др. [9] при лечении экспериментальной туляремии белых мышей аминогликозидами (стрептомицин, гентамицин, амикацин), проявивших *in vitro* высокий уровень активности в отношении возбудителя, продемонстрированы различия в их эффективности в зависимости от инфицирующего штамма.

Канамицин в экспериментах по лечению обезьян, интраназально инфицированных вирулентным штаммом *F.tularensis* Schu S4, позволил большинству обезьян пережить болезнь, но не предотвращал развитие стойких поражений у всех животных [14].

Y. Caspar и M. Maurin [15] показали, что аминогликозиды (особенно гентамицин) активны при определении чувствительности бактерий *in vitro*, однако их бактерицидное действие на внутриклеточно локализованных микробов проявляется только через 72 ч вследствие медленного проникновения через клеточную мембрану эукариот.

В то же время данные по использованию аминогликозидов в клинике не столь однозначны. Например, неэффективность терапии гентамицином была зарегистрирована при лечении детей с ротоглоточной туляремией [16]. Положительный результат лечения в этом случае был достигнут благодаря применению стрептомицина. Данный факт свидетельствует о том, что стрептомицин сохраняет свои позиции и в настоящее время, являясь эффективным препаратом выбора первой линии при лечении туляремии.

Рядом авторов [9, 15] в экспериментах по определению чувствительности *F.tularensis* разных подвидов к рифампицину была установлена его высокая активность в отношении возбудителя. Однако монотерапия туляремии данным антибиотиком нецелесообразна из-за высокой вероятности быстрого появления устойчивых к препарату мутантов [17].

Хлорамфеникол и тетрациклины, с момента их появления, были предложены для лечения туляремии в качестве альтернативы стрептомицину. Так, С. N. Baker и соавт. [10] в опытах *in vitro* показали активность этих препаратов в отношении 15 штаммов *F.tularensis*. Однако в экспериментах на белых мышах, заражённых различными вариантами возбудителя, ни тетрациклин, ни хлорамфеникол не обеспечили выживания лабораторных животных [9].

Активность полусинтетического антибиотика группы тетрациклинов — доксициклина была ус-

тановлена в отношении 36 изолятов *F.tularensis* из Японии [12]. Отсутствия чувствительности к доксициклину не было выявлено *in vitro* ни у одного из 900 штаммов *F.tularensis* разных подвидов, взятых в работу Y. Caspar и M. Maurin [15], однако при использовании доксициклина в экспериментах на животных авторы отмечали частые случаи рецидивов, что согласовывалось с более высокими показателями неудачи лечения этим антибиотиком туляремии у людей. О большом количестве рецидивов также свидетельствуют и исследования P. Russell и соавт. [18]. Эти данные коррелируют с высокими показателями неудачного лечения этим антибиотиком туляремии у людей. На основании полученных результатов С. Rojas-Moreno и соавт. [19] делают вывод о вероятности неэффективного использования тетрациклинов и высоком риске возникновения рецидивов при лечении туляремии у человека. Более того, повышенным уровнем устойчивости к тетрациклинам характеризовались штаммы новой группы *F.tularensis* subsp. *holarctica*, выделенные недавно в Швейцарии [20].

В исследовании А. Ulu Kiliç и соавт. [21] с помощью Е-теста в отношении *F.tularensis* subsp. *holarctica* была установлена более высокая, в сравнении с доксициклином, активность тигециклина — препарата, входящего в новый класс глицилциклинов. Авторы считают, что тигециклин может быть важным терапевтическим альтернативным агентом в случае, если другие антибиотики не могут быть использованы или требуется внутривенная терапия. Однако ограничением применения тигециклина считается его неэффективность при лечении мультирезистентных бактериальных инфекций, его парентеральный способ введения и общая стоимость.

Неоднозначные результаты были получены в результате большого спектра исследований, направленных на изучение перспектив применения препаратов класса бета-лактамов (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы) в лечении туляремии у человека. Об активности *in vitro* моксалактама, цефтазидима, цефотаксима, цефтриаксона в отношении 15 штаммов *F.tularensis* свидетельствовали результаты опытов С. N. Baker и соавт. [10]. А. Hotta и соавт. [12], применив Е-тест, показали отсутствие чувствительности 36 изолятов *F.tularensis* из Японии к бензилпенициллину и цефалотину; чувствительность к семи другим бета-лактамам (азтреонам, цефотаксим, цефокситин, цефтриаксон, цефуроксим, имипенем и меропенем) варьировала среди изолятов. V. Sutura и соавт. сообщили об отсутствии активности карбапенемов в отношении экстра- и внутриклеточных форм двух штаммов *F.tularensis* [22].

При сравнительном изучении антибактериальной активности *in vitro* широкого набора бета-лактамовых антибиотиков М. В. Цимбалитовой и Н. В. Павлович [23] установлено, что представите-

ли рода *Francisella* вне зависимости от подвиговой принадлежности характеризуются высокой природной устойчивостью к пенициллинам и цефалоспорином, и только незначительное количество штаммов обладают средней чувствительностью к цефалоспорином III–IV поколений. Авторами высказано предположение о том, что основной причиной резистентности *F.tularensis* является не ферментативная инактивация антибиотика, а непроницаемость внешних структур микробной клетки или модификация мишени действия препарата.

В исследовании причин множественной лекарственной устойчивости *F.tularensis* Schu S4 E. J. Kopping и соавт. [24] определили значимость эффлюксных насосов и роль белка внешней мембраны TolC в их функционировании.

Эксперименты, направленные на изучение перспектив применения препаратов класса макролидов при туляремии, дают разноплановые результаты, характеризующие возможность или невозможность их применения в лечении туляремии. Известно, что голарктические штаммы туляремийного микроба, циркулирующие в Европе, обладают природной устойчивостью к эритромицину. В то же время голарктические штаммы из очагов Сибири, Дальнего Востока и Японии проявляют чувствительность к антибиотикам группы макролидов [6]. Чувствительность к эритромицину подтверждена в опытах *in vitro* с использованием модифицированного бульона Мюллер–Хинтона в отношении 15 штаммов *F.tularensis* [10] и 36 изолятов *F.tularensis* из Японии [12]. Штаммы *F.tularensis*, выделенные в Швейцарии, показали устойчивость к эритромицину [20], в связи с чем, авторы данного исследования не рекомендуют применять этот антибиотик для лечения случаев туляремии, вызванной голарктическими европейскими штаммами, без предварительной оценки антибиотикочувствительности.

Межштаммовая разница в чувствительности к макролидам установлена в работе H. S. Heine и соавт. [11]. В экспериментах Y. Caspar и M. Maurin [15] активность макролидов была более выражена против *F.tularensis*, выращенного в фагоцитарных клетках, чем в бесклеточных средах. Авторы считают, что макролиды (особенно азитромицин) могут быть альтернативой у пациентов, инфицированных чувствительными к эритромицину штаммами *F.tularensis*.

В последние годы всё более широкое применение в этиотропной терапии инфекционных болезней отводится препаратам группы фторхинолонов. Активность фторхинолонов в отношении 900 штаммов *F.tularensis* разных подвигов была показана как на питательных средах, так и на культуре фагоцитарных клеток [15]. Чувствительность к ципрофлоксацину с помощью E-теста установлена у 36 изолятов *F.tularensis* из Японии [12].

В исследованиях многих авторов показана высокая эффективность фторхинолонов при лечении экспериментальной туляремийной инфекции на различных биологических моделях. В частности, в работе Т. А. Бондаревой и др. [25] при лечении морских свинок, заражённых голарктическим штаммом возбудителя туляремии, показана эффективность спарфлоксацина, пефлоксацина и моксифлоксацина.

Однако эксперименты P. Russell и соавт. [18] свидетельствуют о большом количестве рецидивов при лечении ципрофлоксацином экспериментальной туляремии мышей, заражённых *F.tularensis* Schu S4. Более того, согласно данным М.В. Цимбалистовой и соавт. [26], эффективность этиотропной терапии туляремии на модели лабораторных животных существенно зависит как от биологических особенностей инфицирующего штамма, так и от используемого препарата. Следует обратить особое внимание на тот факт, что даже при выживании мышей после курса лечения, фторхинолоны не обеспечивали полную санацию организма хозяина от бактерий. По-видимому, это и объясняет частоту рецидивирования при туляремийной инфекции.

Эффективность профилактики пероральным введением левофлоксацина установлена на модели ингаляционной туляремии обыкновенной мартышки [27]. Левофлоксацин защищает мышей, интраназально инфицированных летальной дозой *F.tularensis* Schu S4, даже в случае позднего начала лечения (через 72 ч после заражения). Кроме того, авторами показано, что левофлоксацин не препятствует формированию иммунитета и выработке защитных антител. Мыши, успешно леченные левофлоксацином, были почти полностью устойчивы к повторному заражению *F.tularensis* Schu S4 интраназальным путём [28].

Необходимость поиска новых способов антибактериальной терапии туляремии обусловлена рядом причин: потенциальная токсичность препаратов первой линии, высокая частота рецидивов и неудач лечения, особенно при тяжёлых формах болезни, а также возможное использование антибиотикорезистентных штаммов *F.tularensis* в контексте биологической угрозы.

Одним из путей решения проблемы резистентности возбудителя туляремии к антимикробным препаратам является создание современных более результативных антибиотиков, обладающих новыми механизмами действия, а также модификация вариантов уже известных групп антибактериальных препаратов.

В качестве потенциальных новых альтернативных препаратов для лечения туляремии предложены новые синтетические бис-индольные соединения [29], бензоксазолы, фталазины и соединения на основе арилмочевины [30].

Обосновано использование замещённых дифениловых эфиров в качестве платформы для разработки новых химиотерапевтических препаратов для лечения туляремии [31].

Высокую эффективность на моделях мышей и макак, аэрозольно инфицированных *F.tularensis* Schu S4, и низкую степень рецидивов обеспечивает новый синтетический фторциклин TP-271 [32].

Определённым потенциалом для дальнейшей разработки новых антитюляремийных агентов обладает AR-13 (производное ингибитора циклооксигеназы-2 целекоксиба) [33].

Положительные результаты получены при оценке бактерицидного эффекта в отношении *F.tularensis* нового противомикробного средства резазурина [34].

Осуществляются исследования по отбору грибных метаболитов [35, 36] и пептидов насекомых [37], ингибирующих рост возбудителя туляремии.

В связи с нарастанием у многих бактериальных агентов антибиотикорезистентности возобновлён интерес исследователей к поиску специфических бактериофагов, перспективных для лечения инфекций. В то же время, к сожалению, неоднократные попытки выявить вирулентные фаги у туляремийного микроба пока не увенчались успехом. Тем не менее, некоторые авторы предполагают целесообразность проведения таких исследований, которые, помимо научной новизны, могут открыть альтернативные подходы к этиотропной терапии туляремии [38].

Другим вектором научного поиска является поиск способов предотвращения или замедления формирования антибиотикорезистентности у *F.tularensis*. Важность данного направления аргументированно показана в ходе анализа математической модели, в которой сопоставление скорости разработки новых антибактериальных препаратов со скоростью их устаревания за счёт формирования антибиотикорезистентности, продемонстрировало, что в долгосрочной перспективе работа над замедлением формирования антибиотикорезистентности у бактерий для борьбы с инфекциями эффективнее, чем создание новых антибиотиков [39]. Авторы проведённого исследования считают, что разработка таких методов станет основным направлением развития антимикробной терапии в будущем.

В данном направлении усилия ряда учёных нацелены на поиск способов повышения эффективности аминогликозидов при туляремии. Так, установлен синергизм при комбинированном лечении инфицированных *F.tularensis* мышей гентамицином и галлием [40]. Выдвинута гипотеза о том, что галлий, связываясь системами всасывания железа и ингибируя его поглощение, может потенцировать действие гентамицина в отношении *F.tularensis* Schu S4 *in vitro* и *in vivo*.

Для решения проблемы биодоступности стрептомицина, для которого характерна плохая проницаемость мембран микробной клетки и быстрая элиминация, разработаны полимерные липосомы, которые на модели совместного культивирования возбудителя туляремии и макрофагов обеспечивают улучшенную цитозольную доставку стрептомицина в альвеолярные макрофаги [41]. Это исследование свидетельствует о потенциале полимерных липосом в качестве полезной платформы для доставки антибиотиков при терапии внутриклеточных инфекций.

Эффективным способом предотвращения формирования антибиотикорезистентности у возбудителей инфекционных болезней и повышения эффективности этиотропной терапии является использование для лечения комбинаций антибактериальных препаратов, обладающих синергидным характером взаимодействия. Исследования Н. В. Павлович и др. [9] показали, что комбинация аминогликозидов и рифампицина предохраняет от гибели 90–100% животных, заражённых штаммами возбудителя туляремии, вызывающими инфекцию, при которой монотерапия этими препаратами малоэффективна.

Экспериментальные данные Y. Caspar и M. Maugin [15] свидетельствуют о том, что комбинация аминогликозида с фторхинолоном может быть наиболее эффективной альтернативой у пациентов с тяжёлой формой болезни, обеспечивая быструю бактерицидную активность в отношении внеклеточных и внутриклеточных *F.tularensis*.

Относительно малая токсичность и хорошая биодоступность цефалоспоринов обуславливает актуальность исследований, направленных на поиск путей преодоления природной устойчивости *F.tularensis* к данным препаратам. Для повышения эффективности при лечении туляремии предложен способ снижения резистентности возбудителя к цефалоспорином с использованием нетоксичного неионогенного детергента — твина 80 [42]. Авторами доказано, что повышение проницаемости наружной мембраны под воздействием неионогенных ПАВ приводит к существенному снижению устойчивости *F.tularensis* к цефалоспорином *in vitro* и повышению эффективности лечения цефтазидимом в комбинации с твином 80 *in vivo* при экспериментальной туляремии, вызванной голарктическим штаммом.

В качестве способа повышения эффективности ципрофлоксацина в отношении внутриклеточного патогена *F.tularensis* предложен метод его липосомной инкапсуляции [43]. Показано, что однократная доза липосомального ципрофлоксацина, введённая интраназальным или ингаляционным путём, может обеспечить защиту от лёгочной туляремии в экспериментах с мышами [44].

Ряд исследований направлен на поиск вариантов подавления способности возбудителя туляремии к образованию биоплёнок. Так, С. Siebert и соавт. [45], с целью получения модели для изучения антибиотикорезистентности и персистенции францисселл и способов их преодоления, создали вариант *F.tularensis* с мутацией FurA, способствующей устойчивости к ципрофлоксацину за счёт повышенной везикуляции бактерий и образования биоплёнки. Кроме устойчивости к ципрофлоксацину полученный штамм проявлял толерантность ещё и к гентамицину. М. Е. Milton и соавт. [46] в качестве средства, ингибирующего образование бактериальных биоплёнок, предлагают использовать соединения 2-аминоимидазола. Результаты экспериментов S. N. Dean и M. L. van Noek [47] свидетельствуют о потенциале применения при лечении туляремии антибиотиков в сочетании с мапротилином — препаратом, обладающим антибиоплёночной активностью.

Одним из перспективных направлений повышения антибактериальной активности лекарственных препаратов является их целенаправленная доставка к очагу воспаления. Например, С. N. Propst и соавт. [48] показали возможность значительного прогресса в применении дорогостоящих терапевтических средств и методов лечения при использовании наноаэрозольной доставки инкапсулированного в липосомы левофлоксацина. Так, для выживания мышей, заражённых 100 LD₅₀ *F.novicida*, необходимая доза левофлоксацина в такой форме была приблизительно в 94 раза ниже, чем требуемая оральная доза, и в 8 раз ниже, чем эффективная внутрибрюшинная доза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Пакскина Н.Д., Холлин А.В., Мазепа А.В. и соавт. Эпидемическая активность природных очагов туляремии на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ситуации на 2019 г. Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 1. — С. 32–41. / Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Pakskina N.D., Kholin A.V., Mazepa A.V. i soavt. Epidemicheskaya aktivnost' prirodnikh ochagov tulyareмии na territorii Rossijskoj Federatsii v 2018 g. i prognoz situatsii na 2019 g. Problemy osobo opasnykh infektsij 2019; 1: 32–41. [in Russian]
2. Воробьев А.А. Оценка вероятности использования биоагентов в качестве биологического оружия. Эпидемиол и инф болезни. — 2001. — № 6. — С. 54–56. / Vorob'ev A.A. Otsenka veroyatnosti ispol'zovaniya bioagentov v kachestve biologicheskogo oruzhiya. Epidemiol i inf bolezni 2001; 6: 54–56. [in Russian]
3. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Тихонов Н.Г. и соавт. Противодействие биотерроризму как новая проблема эпидемиологии. Эпидемиол и инф болезни. — 2003. — № 2. — С. 4–6. / Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Tikhonov N.G. i soavt. Protivodejstvie bioterrorizmu kak novaya problema epidemiologii. Epidemiol i inf bolezni 2003; 2: 4–6. [in Russian]
4. Kietmann W.F., Ruoff K.L. Bioterrorism: Implications for the Clinical Microbiologist. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 2: 364–381.
5. Oyston P.C., Sjostedt A., Titball R.W. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. Nat Rev Microbiol 2004; 2:12: 967–978.
6. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975. / Olsuf'ev N.G. Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vozбудitelya tulyareмии. M.: Meditsina, 1975. [in Russian]
7. Павлович Н.В. Биологические свойства и факторы патогенности *Francisella tularensis* Диссертация на соискание канд. мед. наук. Саратов; 1993. / Pavlovich N.V. Biologicheskie svojstva i faktory patogen-

ности *Francisella tularensis* Dissertatsiya na soiskanie kand. med. nauk. Saratov; 1993. [in Russian]

В качестве метода повышения эффективности антимикробной терапии при острой лёгочной туляремии предложен способ пост-экспозиционной иммунизации антигенами белков мембранной фракции *F.tularensis*. Иммунизация мышей через 24 ч после их заражения *F.tularensis* Schu S4 обеспечила достоверное повышение эффективности субтерапевтических доз гентамицина [49].

В данном обзоре мы попытались отразить основные достижения и тенденции исследований отечественных и зарубежных учёных, посвящённые этиотропной терапии туляремии. Анализ данных литературы чётко демонстрирует, что лечение туляремии даже рекомендованными антибиотиками связано с определёнными трудностями, которые могут проявляться как в невысокой эффективности отдельных препаратов, так и в высоком проценте рецидивов инфекции после лечения.

Для обеспечения надёжной защиты людей в случае осложнения эпидемиологической обстановки по туляремии, а также в случае чрезвычайных ситуаций, связанных с биотеррористическими угрозами, учёным предстоит продолжить интенсивную экспериментальную работу. Перспективными в плане совершенствования подходов лечения этой особо опасной болезни остаются такие направления, как поиск способов снижения токсичности для организма человека рекомендованных для лечения туляремии антибактериальных препаратов; разработка новых препаратов, эффективных в отношении *F.tularensis*, отличающихся от имеющихся химическим строением и механизмом действия; а также поиск препаратов, способных преодолеть множественную природную резистентность возбудителя.

8. Ellis J., Oyston C.F., Grenn M., Titball R.W. Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 4: 631–646.
9. Павлович Н.В., Тынкевич Н.К., Рыжко И.В., Данилевская Г.И. Обнаружение персистирующей устойчивости к антибактериальным препаратам у некоторых штаммов *Francisella tularensis*. Антибиотики и химиотер. — 1992. — № 10. — С. 29–31. / Pavlovich N.V., Tynkevich N.K., Ryzhko I.V., Danilevskaya G.I. Obnaruzhenie persistiruyushchej ustojchivosti k antibakterial'nym preparatam u nekotorykh shtammov Francisella tularensis. Antibiotiki i khimioter 1992; 10: 29–31. [in Russian]
10. Baker C.N., Hollis D.G., Thomsberry C. Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth. J. Clin Microbiol 1985; 22: 2: 212–215.
11. Heine H.S., Miller L., Halasohoris S., Purcell B.K. In Vitro Antibiotic Susceptibilities of *Francisella tularensis* Determined by Broth Microdilution following CLSI Methods. Antimicrob Agents Chemother 2017; 24: 61: 9.
12. Hotta A., Fujita O., Uda A., Sharma N., Tanabayashi K., Yamamoto Y. et al. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. Jpn J Infect Dis 2013; 66: 6: 534–536.
13. Тынкевич Н.К., Павлович Н.В., Рыжко И.В. Сравнительное изучение эффективности амиксина и стрептомицина при экспериментальной туляремии. Антибиотики и химиотер. — 1990. — № 8. — С. 35–37. / Tynkevich N.K., Pavlovich N.V., Ryzhko I.V. Sravnitel'noe izuchenie effektivnosti amikatsina i streptomitsina pri eksperimental'noj tulyareмии. Antibiotiki i khimioter 1990; 8: 35–37. [in Russian]
14. Baskerville A., Hambleton P., Dowsett A.B. The pathology of untreated and antibiotic-treated experimental tularemia in monkeys. British journal of experimental pathology 1978; 59: 615–623.
15. Caspar Y., Maurin M. *Francisella tularensis* Susceptibility to Antibiotics: A Comprehensive Review of the Data Obtained In vitro and in Animal Models. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2017; 7: 122.

16. Kaya A., Uysal I.Ö., Güven A.S., Engin A., Gültürk A., İçagasioglu F.D., Cevit Ö. Treatment failure of gentamicin in pediatric patients with oropharyngeal tularemia. *Med Sci Monit* 2011; 17: 7: 376–380.
17. Bhatnagar N., Getachew E., Straley S., Williams J., Meltzer M., Fortier A. Reduced virulence of rifampicin-resistant mutants of *Francisella tularensis*. *J Infect Dis* 1994; 170: 4: 841–847.
18. Russel P., Eley S.M., Fulop M.J., Bell D.L., Titball R.W. The efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental tularemia. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 4: 461–465.
19. Rojas-Moreno C., Bhartee H., Vasudevan A., Adiga R., Salzer W. Tetracyclines for Treatment of Tularemia: A Case Series. *Open Forum Infect Dis* [serial online] 2018 Sep 3; 5 (9). Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6122728/>.
20. Origi F.C., Frey J., Pilo P. Characterisation of a new group of *Francisella tularensis* subsp. holarctica in Switzerland with altered antimicrobial susceptibilities, 1996 to 2013. *Euro Surveill* [serial online] 2014 Jul 24; 19 (29). Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080140>.
21. Ulu Kiliç A., Kiliç S., Celebi B., Sencan I. *In Vitro* Activity of Tigecycline Against *Francisella tularensis* Subsp. holarctica in Comparison with Doxycycline, Ciprofloxacin and Aminoglycosides. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47: 1: 189–191.
22. Sutura V., Caspar Y., Boisset S., Maurin M. A new dye uptake assay to test the activity of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4: 36: 1–7.
23. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. Mediasiatica к β -лактамам антибиотикам. *Журн микробиол.* — 2014. — № 1. — С. 3–8. / Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Osobennosti formirovaniya ustojchivosti *Francisella tularensis* subsp. Mediasiatica k β -laktamnym antibiotikam. *Zhurn mikrobiol* 2014; 1: 3–8. [in Russian]
24. Kopping E.J., Doyle C.R., Sampath V., Thanassi D.G. Contributions of TolC Orthologs to *Francisella tularensis* Schu S4 Multidrug Resistance, Modulation of Host Cell Responses, and Virulence. *Infection and immunity* 2019 Mar 25; 87 (4). Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6434128/>
25. Бондарева Т.А., Калининский В.Б., Борисевич И.В., Барамзина Г.В., Фоменков О.О. Сравнительная оценка эффективности современных фторхинолонов при лечении экспериментальной туляремии. Проблемы особо опасных инфекций. — 2008. — № 3 (97). — С. 43–45. / Bondareva T.A., Kalininskij V.B., Borisevich I.V., Baramzina G.V., Fomenkov O.O. Sravnitel'naya otsenka effektivnosti sovremennykh florkhinolonov pri lechenii eksperimental'noj tulyaremii. *Problemy Osobo OPasnykh Infektsij* 2008; 3: 97: 43–45. [in Russian]
26. Цимбалистова М.В., Рыжко И.В., Павлович Н.В. Сравнительный анализ антибактериальной активности фторхинолонов в отношении штаммов возбудителя туляремии трёх основных подвидов. *Клин микробиол и антимикроб химиотер.* — 2009. — Т. 11. — № 2. — С. 37–38. / Tsimbalistova M.V., Ryzhko I.V., Pavlovich N.V. Sravnitel'nyj analiz antibakterial'noj aktivnosti florkhinolonov v otnoshenii shtammov vozbuditelya tulyaremii trekh osnovnykh podvidov. *Klin mikrobiol i antimikrob khimioter* 2009; 11 (2): 37–38. [in Russian]
27. Nelson M., Lever M.S., Dean R.E., Pearce P.C., Stevens D.J., Simpson A.J. Bioavailability and efficacy of levofloxacin against *Francisella tularensis* in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54: 9: 3922–3926.
28. Klimpel G.R., Eaves-Pyles T., Moen S.T., Taormina J., Peterson J.W., Chopra A.K. et al. Levofloxacin rescues mice from lethal intra-nasal infections with virulent *Francisella tularensis* and induces immunity and production of protective antibody. *Vaccine* 2008; 26: 52: 6874–6882.
29. Caspar Y., Sutura V., Boisset S., Denis J.N., Maurin M. Bis-indolic compounds as potential new therapeutic alternatives for tularemia. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4: 24.
30. Gorla S.K., Zhang Y., Rabideau M.M., Qin A., Chacko S., House A.L. et al. Benzoxazoles, Phthalazinones, and Arylurea-Based Compounds with IMP Dehydrogenase-Independent Antibacterial Activity against *Francisella tularensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61: 10.
31. England K., am Ende C., Lu H., Sullivan T.J., Marlenee N.L., Bowen R.A. et al. Substituted diphenyl ethers as a broad-spectrum platform for the development of chemotherapeutics for the treatment of tularemia. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 5: 1052–1061.
32. Grossman T.H., Anderson M.S., Christ D., Gooldy M., Henning L.N., Heine H.S. et al. The Fluorocycline TP-271 Is Efficacious in Models of Aerosolized *Francisella tularensis* SCHU S4 Infection in BALB/c Mice and *Cynomolgus* Macaques. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2017; 61 (8). Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527625/>
33. Hoang K.V., Adcox H.E., Fitch J.R., Gordon D.M., Curry H.M., Schlesinger L.S. et al. AR-13, a Celecoxib Derivative, Directly Kills *Francisella In Vitro* and Aids Clearance and Mouse Survival *In Vivo*. *Front Microbiol* 2017; 8: 1695.
34. Schmitt D.M., O'Dee D.M., Cowan B.N., Birch J.W., Mazzella L.K., Nau G.J. et al. The use of resazurin as a novel antimicrobial agent against *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3: 93.
35. Лиховидов В.Е., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Быстрова Е.В. Получение грибных субстанций и их лабораторные испытания на активность в отношении возбудителя туляремии. *Успехи медицинской микологии.* — 2015. — № 14. — С. 442–445. / Likhovidov V.E., Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Bystrova E.V. Poluchenie gribnykh substansij i ikh laboratornye ispytaniya na aktivnost' v otnoshenii vozbuditelya tulyaremii. *Uspekhi Meditsinskoj Mikologii* 2015; 14: 442–445. [in Russian]
36. Шариков А.М., Пашенова Н.В., Нешумаев Д.А., Новицкий И.А. Исследование антибиотической активности гриба чаги в отношении возбудителя туляремии. *Тихоокеанский медицинский журнал.* — 2010. — № 1(39). — С. 64–65. / Sharikov A.M., Pashenova N.V., Neshumaev D.A., Novitskij I.A. Issledovanie antibioticheskoj aktivnosti griba chagi v otnoshenii vozbuditelya tulyaremii. *Tikhookeanskij Meditsinskij Zhurnal* 2010; 1: 39: 64–65. [in Russian]
37. Vonkavaara M., Pavel S.T., Hölzl K., Nordfelth R., Sjöstedt A., Stöven S. *Francisella* is sensitive to insect antimicrobial peptides. *J Innate Immun* 2013; 5: 1: 50–59.
38. Кочеткова А.О., Гаевская Н.Е., Павлович Н.В., Позожова М.П. Туляремиальные бактериофаги и перспективы их использования. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.* — 2019. — Т. 15. — № 1. — С. 42–46. / Kochetkova A.O., Gaevskaya N.E., Pavlovich N.V., Pogozhova M.P. Tulyaremiynye bakteriofagi i perspektivy ikh ispol'zovaniya. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Jyu.A. Ovchinnikova* 2019; 15: 1: 42–46. [in Russian]
39. McClure N.S., Day T. A theoretical examination of the relative importance of evolution management and drug development for managing resistance. *Proc Biol Sci* 2014; 281: 1797.
40. Lindgren H., Sjöstedt A. Gallium Potentiates the Antibacterial Effect of Gentamicin against *Francisella tularensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 60: 1: 288–295.
41. Su F.Y., Chen J., Son H.N., Kelly A.M., Convertine A.J., West T.E. et al. Polymer-augmented liposomes enhancing antibiotic delivery against intracellular infections. *Biomater Sci* 2018; 6: 7: 1976–1985.
42. Павлович Н.В., Цимбалистова М.В. Способ снижения резистентности возбудителя туляремии к цефалоспорином (варианты). Патент на изобретение RUS 2630645, 2016 март 31. / Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V. Sposob snizheniya rezistentnosti vozbuditelya tulyaremii k tsefalosporinam (varianty). Patent na izobretenie RUS 2630645, 2016 mart 31. [in Russian]
43. Conley J., Yang H., Wilson T., Blasetti K., Di Ninno V., Schnell G. et al. Aerosol delivery of liposome-encapsulated ciprofloxacin: aerosol characterization and efficacy against *Francisella tularensis* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 6: 1288–1292.
44. Hamblin K.A., Wong J.P., Blanchard J.D., Atkins H.S. The potential of liposome-encapsulated ciprofloxacin as a tularemia therapy. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4: 79.
45. Siebert C., Lindgren H., Ferré S., Villers C., Boisset S., Perard J. et al. *Francisella tularensis*: FupA mutation contributes to fluoroquinolone resistance by increasing vesicle secretion and biofilm formation. *Emerg Microbes Infect* 2019; 8: 1: 808–822.
46. Milton M.E., Minrovic B.M., Harris D.L., Kang B., Jung D., Lewis C.P. et al. Re-sensitizing Multidrug Resistant Bacteria to Antibiotics by Targeting Bacterial Response Regulators: Characterization and Comparison of Interactions between 2-Aminoimidazoles and the Response Regulators BfmR from *Acinetobacter baumannii* and QseB from *Francisella* spp. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2018; 5: 15.
47. Dean S.N., van Hoek M.L. Screen of FDA-approved drug library identifies maprotiline, an antibiofilm and antivirulence compound with QseC sensor-kinase dependent activity in *Francisella novicida*. *Virulence* 2015; 6: 5: 487–503.
48. Propst C.N., Nwabueze A.O., Kanev I.L., Pepin R.E., Gutting B.W., Morozov V.N. et al. Nanoaerosols reduce required effective dose of liposomal levofloxacin against pulmonary murine *Francisella tularensis* subsp. novicida infection. *J Nanobiotechnology* 2016; 14: 29.
49. Sutherland M.D., Goodyear A.W., Troyer R.M., Chandler J.C., Dow S.W., Belisle J.T. Post-exposure immunization against *Francisella tularensis* membrane proteins augments protective efficacy of gentamicin in a mouse model of pneumonic tularemia. *Vaccine* 2012; 30: 33: 4977–4982.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Щипелева Ирина Александровна — к. б. н., в. н. с., учёный секретарь, врио начальника научного отдела ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Марковская Елена Ивановна — к. м. н., с. н. с. научного отдела ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Кретенчук Оксана Фёдоровна — к. б. н., с. н. с. научного отдела ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Современное состояние профилактики и лечения лихорадки Чикунгунья

С. Я. ЛОГИНОВА, В. Н. ЩУКИНА, *С. В. БОРИСЕВИЧ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации», Сергиев Посад

The Modern State of Prevention and Treatment of Chikungunya Fever

S. JA. LOGINOVA, V. N. SHCHUKINA, *S. V. BORISEVICH

48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad

Вирус Чикунгунья (CHIKV) — это альфа-вирус, передаваемый людям комарами *Aedes*, традиционно *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*. Вирус вызывает лихорадку Чикунгунья — болезнь, которая характеризуется лихорадкой, тошнотой, головными болями, сыпью и стойкой артралгией. Лихорадка Чикунгунья может быть связана с тяжёлыми осложнениями, включая смерть. С 2005 г. CHIKV распространяется по всему миру, что приводит к эпидемиям в Африке, островах Индийского океана, Азии и совсем недавно в Северной и Южной Америке. Глобально расширяющиеся пандемии с ревматическими расстройствами CHIKV и постинфекционными осложнениями усиливают проблемы общественного здравоохранения. Для лечения этой вирусной инфекции не существует конкретной вакцины или лекарственного средства. Анализ поиска эффективных в отношении CHIKV препаратов показал, что, несмотря на разнообразие направлений исследований, использование современных достижений в молекулярной биологии, нет одобренных и принятых для использования в практической медицине ни этиотропных средств лечения, ни МИБП. Вместе с тем внушают оптимизм новые стратегии в области противовирусных исследований. Комбинированная химиотерапия с интерферонами и противовирусными агентами является привлекательной терапевтической стратегией для обеспечения повышенной противовирусной активности и снижения концентраций препаратов.

Ключевые слова: Вирус Чикунгунья, интерферон, химиопрепарат, культура клеток, молекулярная биология.

The Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus transmitted to people by *Aedes* mosquitoes, usually *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. The virus causes Chikungunya fever, a disease characterized by fever, nausea, headaches, rash, and persistent arthralgia. Chikungunya fever may be associated with severe complications, including death. Since 2005, CHIKV has spread worldwide, leading to epidemics in Africa, Indian Ocean islands, Asia, and, most recently, in the Americas. Globally expanding pandemics with CHIKV rheumatic disorders and post-infectious complications are exacerbating public health problems. There is no specific vaccine or drug to treat this viral infection. Analysis of the search for effective drugs in relation to CHIKV showed that, despite the diversity of research areas, as well as the use of modern advances in molecular biology, there are no etiotropic treatments or medicinal immunobiological preparations (MIBPs) approved for use in practical medicine. However, new strategies for antiviral research are encouraging (inspire optimism?). Combined chemotherapy with interferons and antiviral agents is an appealing therapeutic strategy for providing increased antiviral activity and reducing drug concentrations.

Keywords: Chikungunya virus, interferon, chemotherapy, cell culture, molecular biology.

Новые и вновь возникающие вирусные инфекции представляют собой серьёзную проблему для здравоохранения и ветеринарии. Вирус Чикунгунья (CHIKV), артритогенный альфа-вирус, вызывает взрывоопасные эпидемии с участием миллионов случаев. Глобально расширяющиеся пандемии с ревматическими расстройствами CHIKV и постинфекционные осложнения усиливают проблемы общественного здравоохранения. Однако антивирусная терапия или вакцины для борьбы с инфекцией CHIKV ещё не одобрены. Инфекция, вызванная вирусом Чикунгунья,

является постоянной проблемой во всем мире благодаря эффективной адаптации вирусных векторов *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* mosquitoes. Для борьбы с тяжёлыми случаями CHIKV лихорадки необходимы эффективные противовирусные средства.

Существует настоятельная необходимость в разработке противовирусных препаратов широкого спектра. Новая стратегия в области противовирусных исследований основана на идентификации молекул, нацеленных на функции хозяина, необходимые для размножения вирусов. Ряд одобренных FDA препаратов, используемых для лечения некоторых инфекционных заболеваний человека, представляют собой катионные амфифильные препараты (CADs), которые обладают способ-

ностью подавлять накопление вируса внутри клетки, влияя на несколько структур функций [1].

В последние годы в клинических испытаниях оценивали несколько противовирусных препаратов; однако для клинической терапии не было зарегистрировано ни одно из изученных средств. Разработана система высокопроизводительного скрининга (HTS), основанная на анализе ингибирования слияния клеток, содержащих CHIKV, с опосредованными клетками. С использованием этой системы скрининга *in vitro* выявили потенциальные анти-CHIKV-препараты. Были идентифицированы четыре соединения: никлозамид, нитазоксанид, нифлумовая кислота, тольфеновая кислота. Эти соединения затем дополнительно анализировали с использованием микро-нейтрализационного анализа. Определили, что никлозамид и нитазоксанид обладают способностью подавлять цитопатическое действие CHESV. Активность этих анти-CHIKV соединений была дополнительно подтверждена в RT-qPCR и ИФА. Кроме того, было обнаружено, что никлозамид и нитазоксанид:

- 1) ограничивают проникновение вируса;
- 2) ингибируют как высвобождение вируса, так и передачу от клетки в клетку;
- 3) обладают широкой анти-альфаавиальной активностью, в том числе против двух клинических изолятов CHIKV и двух альфа-вирусов: вирус Синдбис (SINV) и вирус леса Семлики (SFV).

Показано, что никлозамид и нитазоксанид способны ингибировать проникновение и передачу CHIKV, что может служить основой для разработки новых лекарственных препаратов для людей против CHIKV и других альфа-вирусных инфекций [2].

Выявлен новый класс малых молекул ([1,2,3] триазоло [4,5-d] пиримидин-7(6H)-триазинонов) с высокой активностью *in vitro* против изолятов CHIKV, выделенных из разных географических регионов. Биохимические анализы с использованием nsP1 вируса везикулярного энцефалита показали, что соединения специфически ингибируют гуанилирование nsP1. Учитывая отсутствие вариантов лечения инфекций CHIKV, эта серия соединений с их уникальной (специфичной для альфа-вируса) мишенью даёт надежду разработать терапию для инфекций CHIKV [3].

В качестве прототипа этого класса молекул для изучения конкретных характеристик и механизма действия анти-CHIKV активности был выбран препарат MADTP-314. Было показано, что MADTP-314 имеет профиль ингибирования, который сопоставим с профилем ингибирования полимеразы (препаратом T-70512), то есть соединение оставалось активным, когда добавление к заражённым культурам было отложено на несколько часов (свыше 6 ч) после инфицирования.

Снижение РНК CHIKV для MADTP-314 и T-705 составило, соответственно, $1,3 \log_{10}$ и $1,0 \log_{10}$ при добавлении через 6 ч после инфицирования и оценки через 24 ч после инфицирования [3]. Ингибиторы малых молекул, аффинные к белку nsP1, альфа-вируса способны эффективно и полностью подавлять репликацию CHIKV *in vitro* при концентрациях, которые не оказывают отрицательного влияния на клетку-хозяина. Как показано на прототипном соединении MADTP-314, триазолопиримидиноны не ингибируют проникновение CHIKV. Трансфекция клеток рекомбинантной РНК CHIKV показала, что MADTP-314 не влиял непосредственно на трансляцию белков, необходимых для экспонирования геномов.

Поскольку в настоящее время нет вариантов лечения инфекции, соединения MADTP с их уникальной (специфичной для альфа-вируса) мишенью дают многообещающую отправную точку для разработки терапии инфекций CHIKV (необходимы классические доклинические и клинические исследования). При получении положительных результатов доклинических исследований структуру nsP1 CHIKV или другого альфа-вируса в будущем можно будет использовать для конструирования лекарственных препаратов на основе структуры новых классов ингибиторов. Очень важно изучить (сначала на моделях животных), могут ли ингибиторы CHIKV оказывать терапевтическое влияние на хронические инфекции суставов, вызванные этим вирусом. Мощные и безопасные препараты, ингибирующие CHIKV, могут также использоваться для профилактики в эндемичных регионах [3].

Изучение активности класса тиено [3,2-b] пирролов и открытие тризамещённого тиено [3,2-b] пиррол-5-карбоксамиды 15с показало, что оно проявляет высокую ингибирующую активность против инфекции CHIKV *in vitro*. Соединение 15с демонстрирует низкую микромолярную активность (значение EC_{50} около 2 мкМ) и ограниченное цитотоксическое действие ($CC_{50} > 100$ мкМ), поэтому оно даёт индекс селективности, превышающий 32. Примечательно, что соединение 15с не только контролирует продуцирование вирусной РНК, но эффективно ингибирует экспрессию белков CHIKV nsP1, nsP3 и E2 в концентрации менее 2,5 мкМ. Что более важно, соединение 15с также выявило антивирусную активность широкого спектра действия против других клинически важных альфа-вирусов, таких как вирус О'Ньюнг-Ньюнг и вирус Синдбис [4].

Ранее было идентифицировано вещество 3-арил-[1,2,3] триазоло [4,5-d] пиримидин-7 (6H)-она в качестве селективных ингибиторов репликации CHIKV, в качестве мишени служил фермент сборки вируса nsP1. Синтезированы новые серии родственных соединений, несущих на

арильном фрагменте метилкетон и родственные оксими в сочетании с этильной или этимимической в 5-положении триазолопиримидинона. Эти соединения показали противовирусную активность в отношении различных изолятов CHIKV в очень низком диапазоне мкМ по снижению репродукции вируса. Более того, эти противовирусные средства ингибируют *in vitro* гуанилирование гена альфа-вируса nsP1. Таким образом, полученные данные, по-видимому, указывают на то, что активность анти-CHIKV может быть связана с ингибированием этой важной стадии — кэпированием вирусной РНК [5]. Полученные данные подчёркивают важность структурного положения метильной группы в 5' части триазолопиримидина. Как стерические, так и электронные свойства соединения очень важны. С другой стороны, новые синтезированные оксими ясно показывают, что функционализация метилкетона в положении 3 арильного кольца путём деривации оксима и включение дистальных аминов улучшает противовирусную активность препаратов в отношении CHIKV. Данные, полученные при изучении гуанилирования мРНК nsP1, также свидетельствуют о том, что эти оксими являются более мощными ингибиторами стадии гуанилирования, чем исходный препарат. Триазолопиримидины представляют первые соединения, способные ингибировать реакцию гуанилирования в укрупнении мРНК альфа-вируса [5].

Принимая во внимание тяжёлые последствия этой инфекции, есть потребность в поиске соединений, которые способны эффективно и выборочно вмешиваться в репликацию CHIKV [6]. Поскольку вероятность развития хронической болезни CHIKV, по-видимому, коррелирует с тяжестью симптомов во время острой фазы инфекции, мощный противовирусный препарат, назначаемый во время острой инфекции, может уменьшить шансы на развитие хронического заболевания [7]. Однако пока неясно, может ли терапия против CHIKV быть полезной для купирования развития хронического CHIKV-индуцированного артрита. Соединения природного происхождения, такие как флавоноиды [8], известные лекарственные средства, такие как никлозамид [2] и сурамин [9] или синтетические соединения [4, 10], ингибируют инфекцию CHIKV в опытах *in vitro* [11].

Флавоноиды представляют собой группу полифенольных соединений растений, которые синтезируются по пути фенилпропаноидов. На протяжении многих лет различные типы флавоноидов были предметом исследований по их широкому спектру лекарственных средств — антиоксидантной, противоопухолевой, противовоспалительной и антимикробной активности. Сообщалось о различных флавоноидах с противовирусными свойствами против вируса Денге

(DENV), вируса простого герпеса (HSV), цитомегаловируса человека (HCMV) и т. д. [12–14].

Гесперетин взаимодействует со всеми четырьмя неструктурными белками CHIKV в дополнение к SPK2, который играет роль в цикле репликации вируса. Эти результаты указывают на возможный основной механизм ингибирования репликации CHIKV и позволяют продолжить исследования этих целевых белков для разработки нового анти-CHIKV препарата [15]. Скрининг *in vitro* показал, что Гесперетин (биофлавоноид) оказывает ингибирующее действие на внутриклеточную репликацию вируса. Гесперетин связывается с белками важными для репликации CHIKV и эффективно блокирует вирусную внутриклеточную репликацию. Белок nsP3 служит в качестве потенциального целевого белка для ингибирующего действия соединения. Таким образом, Гесперетин демонстрирует противовирусные свойства, которые потенцируют его как терапевтический препарат для лечения инфекции, вызванной CHIKV [15].

Сурамин®, также известный как Germanin или Bayer-205, является зарегистрированным на рынке лекарством, однако проявляет значительные побочные эффекты, что, вероятно, препятствует его использованию в качестве препарата для лечения CHIKV, но из-за высокой летальности вирусных инфекций, вызванных вирусом Эбола, Сурамин® может быть использован против инфекции Эбола [16]. Сурамин® имеет отрицательный заряд и связывается с основными боковыми цепями белков. Было описано, что репродукция некоторых вирусов ингибируется препаратом Сурамин®, среди них ВИЧ [17, 18] HSV-1 [19], HBV [20], HCV [21], вирус Денге [22], EV71 [23], вирус лихорадки долины Рифт [24], а также и CHIKV [9, 25].

Изучение эффективности препарата Сурамин® *in vivo* на мышах C57BL/6 показало, что применение препарата значительно уменьшало вирусные нагрузки, а также значительно улучшало острые поражения ног у мышей, восстанавливало целостность хряща и уменьшало количество положительного хондроцита ИНС у животных, инфицированных штаммами CHIKV 0810bTw и 0706aTw [26]. Это исследование *in vivo* подчёркивает потенциальную способность препарата Сурамин® лечить инфекцию CHIKV в клинических условиях.

На основе структурных особенностей препарата Сурамин® были разработаны 20 новых конъюгированных соединений в семействах бис (бензофуран-1,3-тиазолидин-4-он) и бис (бензофуран-1,3-тиазин-4-он). Эти новые соединения были синтезированы химическими методами, и их структуры были подтверждены спектроскопически. В анализах подавления ЦПД шесть из этих новых бис-конъюгатов ингибировали репликацию CHIKV в клетках Vero E6 с EC₅₀ в диапазоне

1,9–2,7 мкМ, и значения индекса селективности ~75 или выше. Эти результаты обеспечивают отправную точку для дальнейшей оптимизации, проектирования и синтеза новых противовирусных агентов для этого (повторно) возникающего заболевания [27].

Недавно были выделены новые дифененоиды дафнана, тиглиана и ятрофана из различных видов *Euphorbiaceae*, некоторые из них являются мощными ингибиторами репликации вируса Чикунгунья (СНІKV). Для дальнейшего изучения этого типа соединения была оценена противовирусная активность серии из 29 коммерчески доступных природных дитерпеноидов. Phorbol-12,13-дидеканоат оказался наиболее мощным ингибитором с величиной EC_{50} $6,0 \pm 0,9$ нМ и индексом селективности (SI) 686. Большинство других соединений проявляли активность от низкой до умеренной активности, включая дитерпеновый эфир ингенанового типа, с величиной EC_{50} $1,2 \pm 0,1$ мкМ и SI=6,4. Известно также, что соединения дитерпены ингибируют репликацию ВИЧ, поэтому антивирусную активность соединений 1-29 оценивали также против ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Было показано, что тиглеванин (4 β -гидроксифорбольные аналоги) и энгенановые дитерпеновые эфиры ингибируют репликацию ВИЧ *in vitro* на наномолярном уровне. Анализ, выполненный с наборами анти-СНІKV и анти-ВИЧ, продемонстрировал линейную зависимость, которая подтвердила гипотезу о том, что РКС может быть важной мишенью в репликации СНІKV [28].

Малые гетероциклические молекулы, такие как пиперазин, являются потенциальными фармакотерапевтическими агентами, и связывание этих молекул с гидрофобным карманом капсидного белка (СР) открывает новую перспективу для терапевтического вмешательства. Исследования молекулярных взаимодействий показали, что пиперазин связывается с гидрофобным карманом вируса Чикунгунья (СНІKV) с высокой аффинностью. Кроме того, антивирусная активность пиперазина против вируса Чикунгунья (СНІKV) была исследована методом релаксации бляшек и иммунофлуоресценции [29].

Противовирусную активность интерферона-альфа и йота-каррагинана оценивали по снижению цитопатического эффекта альфа-вируса на инфицированных клетках Vero и уменьшению титра вируса. С СНІKV и SFV показатели селективности человеческого рекомбинантного интерферона альфа (ИФН- α) и йота-каррагинана были намного выше, чем показатели препарата Рибавирин®, который ранее был исследован на предмет его ингибирующего действия на альфа-вирусные инфекции. По сравнению с препаратом Рибавирин® 6-азауридин был более эффективен против СНІKV и проявлял сходную противовирусную активность против SFV [30]. ИФН альфа-2b, глицирризин, 6-азауридин и

Рибавирин® вызывали зависящее от концентрации снижение выхода вируса СНІKV и SFV. Более того, комбинация ИФН альфа-2b и препарат Рибавирин® оказывает противосудорожное противовирусное действие на эти два альфа-вируса и должна оцениваться для лечения этих инфекций [31].

Рибавирин® (1- β -d-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) показал широкую ингибирующую активность *in vitro* в отношении РНК-содержащих вирусов с различными режимами действия в зависимости от вируса [32]. Рибавирин® одобрен FDA для клинического использования. Некоторые из предложенных механизмов действия связаны с ингибированием IMP-дегидрогеназы, препарат вызывает мутации и ингибирует взаимодействие с вирусной полимеразой [33]. Предварительные наблюдения показали, что Рибавирин® может иметь прямую противовирусную активность против СНІKV. По сравнению с препаратом Рибавирин® 6-азауридин, антиметаболит широкого спектра действия, был более эффективен против СНІKV и проявлял сходную противовирусную активность против SFV [31, 34].

Доклинические исследования показали, что монотерапия препаратом Рибавирин® задерживает репродукцию СНІKV, но не полностью его подавляет. Кроме того, высокие концентрации препарата Рибавирин® были необходимы для достижения существенного противовирусного эффекта (с EC_{50} и EC_{90} значениями 142,70 мкг/мл и 238,35 мкг/мл, соответственно). Эти концентрации выходят за пределы терапевтического окна для препарата Рибавирин® и считаются токсичными для человека. Например, клиническая доза препарата Рибавирин® составляет 600 мг два раза в день (на основании рекомендаций по дозировке HCV) и дает максимальную 24-часовую экспозицию AUC $48 \text{ мг} \times \text{ч/л}$ [35]. Значение EC_{50} для препарата Рибавирин® против СНІKV ($142,70 \text{ мкг/мл} \times 24 \text{ ч}$) с 24-часовой экспозицией AUC равна $3425 \text{ мг} \times \text{ч/л}$, а EC_{90} ($238,35 \text{ мкг/мл} \times 24 \text{ ч}$) эквивалентен экспозиции $5720 \text{ мг} \times \text{ч/л}$. Эти экспозиции в 71 раз и в 119 раз выше, чем стандартные клинические дозировки и не приемлемы для людей из-за токсичности. Таким образом, монотерапия препаратом Рибавирин® не является подходящим режимом лечения инфекции СНІKV у людей [36].

В небольшом клиническом исследовании 10 пациентов с СНІKV и длительными симптомами артрита лечили препаратом Рибавирин® в дозе 200 мг два раза в день в течение недели [37]. У всех пациентов, получавших Рибавирин®, наблюдалось снижение боли в суставах, а у 80% уменьшалось сужение и разбухание мягких тканей. Хотя эти данные свидетельствуют о том, что Рибавирин® может быть эффективным для снижения проявлений СНІKV-заболеваний у людей, прямая противовирусная активность Рибави-

вирина® против СНІKV у человека, по-прежнему, остается неясной.

СНІKV высокочувствителен к противовирусной активности интерферонов типа I (ИФН- α/β). А.-С. Bréhin и соавторы [38] исследовали роль ИФН-индуцированного семейства 2'-5'-олигоаденилата синтетазы (ОАС) во врожденном иммунитете к СНІKV. Клетки HeLa реагируют на эктопическую экспрессию ОАС3, эффективно ингибируя рост СНІKV. Характерным для противовирусного эффекта была блокада репликации вируса на ранних стадиях. Таким образом, путь ОАС3 может представлять новый анти-альфа-вирусный механизм, посредством которого ИФН- α/β контролирует размножение СНІKV. Клетки HeLa, экспрессирующие усеченную форму ОАС3, были менее устойчивы к инфекции СНІKV, что ставит вопрос об участии генетического полиморфизма ОАС3 в восприимчивости человека к альфа-вирусной инфекции [38]. В другом исследовании [39] был идентифицирован вариант СНІKV, демонстрирующий значительное увеличение антивирусной активности ОАС3 путём усиления репликации вирусной РНК. Было показано, что однократное изменение аминокислоты в гликопротеине Е2 позволяет обеспечить репродукцию вируса в клетках HeLa, экспрессирующих ОАС3, воздействуя на ранние стадии жизненного цикла вируса. ИФН- α способен формировать антивирусное состояние в клетках HeLa. Обработка клеток HeLa 1000 IU мл человеческого ИФН- α за 5 ч до инфицирования СНІKV приводила к подавлению репродукции $\sim 1,5 \log$ в течение 18 ч. Таким образом, ИФН-зависимые антивирусные пути функционируют в клетках HeLa и обеспечивают защиту от СНІKV на клеточном уровне. Однако СНІKV-инфицированные клетки HeLa показали полную резистентность к ИФН- α через 5 ч после инфицирования, когда процесс репликации вируса запущен. Эти наблюдения также дают новое представление о роли Е2 в патогенности СНІKV в клетках человека [39]. Монотерапия ИФН- α была эффективной против СНІKV при высоких концентрациях. Уровни ИФН- α , по меньшей мере, 100 МЕ мл подавляют продукцию СНІKV на 1-й день после терапии, но 10 000 МЕ мл необходимы для поддержания противовирусной активности через 3 дня. ЕС₅₀ для ИФН- α составляла 2571,41 МЕ мл, а ЕС₉₀ составляла 15 063,51 МЕ мл, показатели были рассчитаны в течение 3-дневного исследования. Максимальная клиническая доза ИФН- α составляет 36 млн МЕ ежедневно [40]. Более высокие клинические дозы не могут быть введены пациентам из-за токсичности. Таким образом, эти исследования показывают, что ИФН- α в качестве монотерапии эффективен только в дозах выше терапевтических и не подходит для лечения СНІKV.

Комбинированная химиотерапия с 2 и более противовирусными агентами является привлекающей терапевтической стратегией для обеспечения повышенной противовирусной активности. Эта стратегия была использована для лечения инфекций вируса гепатита С и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Исследования показали, что комбинированная терапия с препаратом Рибавирин® и ИФН- α является синергетической для подавления СНІKV *in vitro* [41]. Синергические взаимодействия между препаратом Рибавирин® и ИФН- α дают возможность использовать более низкие концентрации каждого препарата в комбинации без снижения противовирусной активности. Результаты исследований показывают, что Рибавирин® и ИФН- α в комбинированной химиотерапии являются синергетическими, что приводит к усилению подавления вирусной репродукции по сравнению с группами лечения монотерапией. Эти данные свидетельствуют о том, что комбинированная терапия может быть терапевтической стратегией для СНІKV, так как могут быть достигнуты высокие показатели вирусного ингибирования при физиологических воздействиях, когда Рибавирин® и ИФН- α вводят вместе. Чтобы исследовать эту гипотезу, провели компьютерное моделирование для прогнозирования степени подавления вирусной репликации, когда одновременно вводили в стандартном клиническом режиме Рибавирин® (пероральная доставка 600 мг два раза в день) и ИФН- α (одна инъекция 18 млн МЕ). Результаты моделирования прогнозировали снижение вирусной нагрузки на $2,5 \log_{10}$ после 24 ч терапии. Это предположение было подтверждено экспериментально при использовании системы HFIM. Таким образом, результаты исследований показывают, что терапия препаратом Рибавирин® плюс ИФН- α при стандартных клинических режимах может снизить уровни СНІKV на 99% через 24 ч после терапии. Учитывая, что эксперименты проводились в отсутствие иммунного ответа, расчёты противовирусной активности могут быть занижены, в связи отсутствия учёта функционирующей иммунной системы [42, 43].

Таким образом, Рибавирин® и ИФН- α обладают противовирусной активностью против СНІKV и проявляют синергетический эффект при использовании в качестве комбинированной химиотерапии. Это исследование показывает, что стандартный клинический режим препарата Рибавирин® и ИФН- α подавляет репликацию СНІKV и, таким образом, может служить потенциальной терапевтической стратегией для инфицированных пациентов. Однако необходимо провести дополнительные исследования, чтобы определить эффективность этого режима в клинических условиях.

Антивирусные препараты действуют путём таргетинга на определённые этапы цикла репли-

кации вируса, тем самым препятствуя вирусному проникновению, репликации и почкованию. Большинство молекул анти-СНІKV были идентифицированы путём тестирования соединений с уже установленными противовирусными свойствами. Favipiravir (Т-705) — противовирусное средство, одобренное в Японии для лечения вируса гриппа, вместе с его дефторированным аналогом Т-1105, ингибировал репликацию СНІKV *in vitro* [44]. Кроме того, у инфицированных СНІKV мышей AG129, получавших перорально Т-705, было выявлено менее тяжёлое неврологическое заболевание и более 50% снижение смертности [44].

М. Bassetto и соавт. [45] использовали биоинформатический подход с учётом гомологичной модели вируса СНІKV на основе кристаллической структуры nsP2 альфа-вируса VEE в качестве матрицы. В исследовании было обнаружено несколько соединений, которые селективно ингибировали СНІKV в исследовании подавления ЦПД в культуре инфицированных клеток. Недавняя работа [46] показала, что белок nsP4 СНІKV участвует в механизме действия Т-705 (favipiravir), который, как было замечено, ингибирует репликацию СНІKV *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, необходимо нацеливать другие вирусные белки также на конструкцию лекарственного препарата на основе структуры.

Недавно было идентифицировано несколько новых соединений с малыми молекулами, которые подавляют репликацию СНІKV *in vitro*. Было обнаружено, что соединения, которые избирательно нацелены на nsP1 и nsP2, обладают ферментативными свойствами, необходимыми для репликации вируса, ингибируют репликацию вируса [47]. Нуклеозидный аналог β -DN 4-гидроксицитидин (ННС), ранее показавший эффективность в отношении вируса гепатита С, селективно ингибирует репликацию СНІKV *in vitro* и оказывается более сильным, чем Фавипиравир® и Рибавирин® [48].

Арбидол® (этил-6-бром-4-[(диметиламино)метил]-5-гидрокси-1-метил-2-[(фенилтио)метил]индол-3-карбоксилат гидрохлорид моногидрат) — противовирусное лекарственное средство, первоначально лицензированное в России для использования против гриппа и других респираторных вирусных инфекций. Хотя сообщалось о противовирусной активности широкого спектра действия для этого препарата, до сих пор нет данных о его влиянии на альфа-вирусную инфекцию. Было исследовано противовирусное действие препарата Арбидол® на вирус Чикунгунья (СНІKV) *in vitro*. Было показано, что это соединение обладает ингибирующей активностью против вируса в клетках Vero и первичных человеческих фибробластах (клетки лёгких MRC-5) (IC₅₀ <10 мкг/мл) [49].

За последние 10 лет сложилась стратегия молекулярного дизайна противовирусных препара-

тов. Современные методы исследований позволяют проследить весь цикл взаимодействия клетки с отдельной вирусной частицей в реальном времени, однако эти новые данные мало используются для построения одной общей теории процесса вирус — клеточное взаимодействие, способной прогнозировать влияние различных вирусов на культуру клеток или живой организм, а также для возможных путей блокирования данного процесса. Появились новые методы и подходы изучения картины взаимодействия «вирус—хозяин», в основе которых лежит возможность изучения изменения всех известных компонентов изучаемой системы на уровне генома, транскриптома, протеома и т. д. Появление системной вирусологии стало возможным благодаря появлению высокотехнологичных технологий. Генетические манипуляции с вирусом позволили идентифицировать некоторые вирусные маркеры, которые связаны с вирулентностью и патогенезом. Прогресс в молекулярной биологии за последние 20 лет позволил внедрить в клиническую практику лекарственные препараты на основе олигонуклеотидов. Одним из направлений является создание противовирусных препаратов на основе малых интерферирующих РНК (миРНК). РНК-интерференция (RNAi) представляет собой посттранскрипционный процесс, вызванный введением двухцепочечной РНК (dsRNA), которая приводит к отключению генов специфичным для последовательности образом. Метод основан на выключении специфических вирусных белков, что, следовательно, приводит к остановке процесса экспрессии белка, тем самым останавливая репликацию вируса. RNAi-опосредованное ингибирование репликации вируса стало многообещающей антивирусной стратегией. Небольшая интерферирующая РНК (siRNA) и небольшие молекулы РНК (shRNA) шпильки являются центральными для интерференции РНК [50].

Терапевтическое применение siRNA для ингибирования репликации СНІKV было исследовано в клетках Vero [51]. Были разработаны siRNAs против консервативных областей генов nsP3 и E1 СНІKV, активность siRNA оценивали путём обнаружения как инфекционного вируса, так и его генома. Титры выхода вируса в культуральную жидкость определяли через 24 и 48 ч после введения. Результаты показали снижение титра вируса на $\sim 1,5 \log_{10}$ и $\sim 2,5 \log_{10}$ по сравнению с контролем. Таким образом, исследование показало ограниченный успех и нужно дополнительное изучение этих последовательностей siRNA в модели *in vivo* для конечного терапевтического применения. Исследования также проводились в Национальном институте вирусологии в Пуне (Индия), путём проектирования восьми siRNAs, нацеленных на гены E2 или ns1 СНІKV. Эффек-

тивность этих siRNAs для ингибирования продуцирования CHIKV оценивали в клетках Vero. Две из siRNAs снижали транскрипты CHIKV E3 на $\sim 5 \log_{10}$ и $\sim 2,5 \log_{10}$, когда клетки были трансфицированы через 1 ч после инфекции. Было обнаружено, что 100 пмоль siRNA оптимально влияет на продукцию CHIKV. Установлено, что комбинация этих siRNAs очень эффективна в ингибировании продуцирования CHIKV. Важно отметить, что эти siRNAs могут ингибировать репликацию CHIKV у мышей швейцарских альбиносов (Swiss albino) при введении через 72 ч после инфицирования. Показано, что доза siRNA 1 мг/кг массы тела (1700 пмоль) оказалась оптимальной для ингибирования репликации CHIKV у мышей швейцарских альбиносов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что РНК интерференция способна подавлять репродукцию вируса генами, специфичными для последовательности CHIKV, и может стать новой терапевтической стратегией в отношении инфекции CHIKV [52].

Иммунотерапия в форме человеческих поликлональных антител использовалась для лечения вирусных инфекций человека, а в моделях животных, инфицированных альфа-вирусами, пассивная иммунизация с выздоравливающими сыворотками животных была защитной. Показано, что сыворотки от пациентов и обезьян, которые получали при острых альфа-вирусных инфекциях, содержат нейтрализующие антитела. Человеческие поликлональные антитела (CHIKV Ig) были очищены из плазмы выздоравливающих доноров и использовались в мышинных моделях инфекции CHIKV [53]. Были получены многообещающие результаты с Ig CHIKV, показывающие как профилактический, так и терапевтический потенциал. Как у ИФН- α/β R-/-, так и у иммунокомпетентных новорождённых мышей, была установлена одна профилактическая доза Ig CHIKV, защищающая от летальности, вызванной CHIKV, с подавлением вируса в сыворотке крови и отсутствием распространения в центральной нервной системе. Степень защиты коррелирует с дозой вводимых антител. CHIKV Ig также обладает терапевтическим эффектом, так как он защищает от летальности при назначении до 8 ч после инфицирования. Результаты также подтверждают гипотезу о том, что виремия предшествует распространению вируса в ЦНС и контроль виремии предотвращает неврологические осложнения [53].

С другой точки зрения, терапевтическая эффективность моноклональных/поликлональных антител может быть ограничена, поскольку пациенты с серодиагностикой альфа-вирусного заболевания явно уже имеют антитела, а введение антител до получения эндогенного антитела, вероятно, будет неэффективным. Тем не менее, такие

антитела могут найти применение в профилактике передачи инфекции от матери к ребенку. Разумеется, нейтрализующие антитела можно использовать профилактически во время эпидемии. Однако парентерально вводимые антитела (такие как тоцилизумаб и инфликсимаб) имеют период полувыведения в сыворотке всего 8–14 дней, поэтому требуется повторная дозировка [54].

Альтернативный подход к борьбе с вирусными заболеваниями включает использование вакцин. До сих пор нет эффективной вакцины для профилактики заболевания лихорадки Чикунгунья. В 1967 г. формалин-инактивированные вакцины CHIKV были получены в эмбрионах цыплят и головном мозге мыши и в 1972 г. в культуре тканей почек зелёной обезьяны [55, 56]. В 1970 г. вакцина CHIKV была получена путём экстракции эфиром [57]. В 1973 г. E. Nakao и S. Hotta [58] показали, что инактивированный ультрафиолетом вирус превосходит формализированный вирус в отношении его иммуногенности у обезьян.

Было описано несколько доклинических исследований эффективности вакцин CHIKV, включая инактивированные вирусные частицы [59], вакцины против вируса с живой аттенуацией [60], химерные вирусные вакцины [61], ДНК-вакцины [62], пептид на основе Т-клеток вакцины [63], рекомбинантной аденовирусной вакцины [64], субъединичных белковых вакцин [65] и состава вирусоподобной частицы (VLP) [66]. Иммуногенный потенциал рекомбинантных белков оболочки CHIKV оценивали у мышей. Рекомбинантный белок вызывал сильный гуморальный ответ и сбалансированный ответ Th1/Th2. Рекомбинантные антигены CHIKV могут быть предложены в качестве субъединичных вакцинных кандидатов [67]. Разработана активная вакцина CHIKV, основанная на включении пикорнавиры (IRES) в геном CHIKV (CHIKV IRES). Вакцина значительно ослаблена путём удаления значительной части гена, кодирующего nsP3, или всего гена, кодирующего 6K, но иммуногенна в моделях на мышах и неспособна к репликации в клетках комаров [68].

Анализ поиска эффективных в отношении CHIKV препаратов показал, что, несмотря на разнообразие направлений исследований и использование современных достижений в молекулярной биологии, нет одобренных и принятых для применения в практической медицине ни этиотропных средств лечения, ни МИБП.

Вместе с тем внушают оптимизм новые стратегии в области противовирусных исследований, основанных на идентификации молекул, нацеленных на функции хозяина, необходимые для размножения вирусов; выявление вирусных маркеров, которые связаны с вирулентностью и патогенезом; поиск целевых белков для ингибиро-

вания репликации СНІКВ; внедрение в клиническую практику лекарственных препаратов на основе олигонуклеотидов.

Комбинированная химиотерапия с интерферонами и противовирусными агентами является привлекательной терапевтической стратегией для

обеспечения повышенной противовирусной активности и снижения концентраций препаратов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Salata C., Calistri A., Parolin C., et al. Antiviral activity of cationic amphiphilic drugs Expert Rev Anti Infect Ther 2017; 20: 1–10.
- Wang Y.M., Lu J.W., Lin C.C. et al. Antiviral activities of niclosamide and nitazoxanide against Chikungunya virus entry and transmission. Antiviral Res 2016; 135: 81–90.
- Delang L., Li C., Tas A. et al. The viral capping enzyme nsP1: a novel target for the inhibition of Chikungunya virus infection. Sci Rep 2016; 6: 31819.
- Ching K.C., Kam Y.W., Merits A. et al. Trisubstituted Thieno[3,2-b]pyrrole 5-Carboxamides as Potent Inhibitors of Alphaviruses. J Med Chem 2015; 58 (23): 9196–9213.
- Gigante A., Gómez-SanJuan A., Delang L. et al. Antiviral activity of [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones against Chikungunya virus targeting the viral capping nsP1. Antiviral Res. 2017; 144: 216–222.
- Abdelnabi R., Neyts J., Delang L., Abdelnabi, R. Towards antivirals against Chikungunya virus. Antivir Res 2015; 121: 59–68.
- Abdelnabi R., Neyts J., Delang L. Chikungunya virus infections: time to act, time to treat. Curr Opin Virol 2017; 24: 25–30.
- Lani R., Hassandarvish P., Shu M.-H. et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. Antivir Res 2016; 133: 50–61.
- Albulescu I.C., van Hooijwerff M., Wolters L.A. et al. Suramin inhibits Chikungunya virus replication through multiple mechanisms. Antivir Res 2015; 121: 39–46.
- Mishra P., Kumar A., Mamidi P. et al. Inhibition of Chikungunya virus replication by 1-[(2-Methylbenzimidazol-1-yl) methyl]-2-oxo-indolin-3-ylidene] amino] thiourea(MBZM-N-IBT). Sci Rep 2016; 6: 20122.
- Varghese S., Thaa B., Amrun S.N. et al. The antiviral alkaloid berberine reduces Chikungunya virus-induced mitogen-activated protein kinase signaling. J Virol 2016; 90: 9743–9757.
- Cotin S., Calliste C.-A., Mazon M.-C. et al. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. Antiviral Research 2012; 96 (2): 181–186.
- Moghaddam E., Teoh B.-T., Sam S.-S. et al. Baicalin, a metabolite of baicalin, an antiviral activity against dengue virus. Scientific Reports 2014; 4: 5452.
- Ahmadi A., Hassandarvish P., Lani R. et al. Inhibition of Chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. RSC Advances 2016; 6: 69421–69430.
- Oo D., Hassandarvish P., Chin S. P. et al. In silico study on anti-Chikungunya virus activity of hesperetin. Peer J 2016; 4: e2602.
- Henß L., Beck S., Weidner T. et al. Suramin is a potent inhibitor of Chikungunya and Ebola virus cell entry. Virol J 2016; 13: 149.
- Mitsuya H., Popovic M., Yarchoan R. et al. Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. Science. 1984; 226: 172–174.
- Yahi N., Sabatier J.M., Nickel P. et al. Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells. J Biol Chem 1994; 269: 24349–24353.
- Aguilar H.C., Anderson W.F., Cannon P.M. Cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein influences the conformation of the extracellular domain: implications for mechanism of action of the R Peptide J Virol 2003; 77: 1281–1291.
- Kessler H.A., Pottage J.C., Trenholme G.M. et al. Effects of suramin on in vitro HBsAg production by PLC PRF 5 cells and hepatitis B virus DNA polymerase activity. AIDS Res 1986; 2: 63–72.
- Garson J.A., Lubach D., Passas J. et al. Suramin blocks hepatitis C binding to human hepatoma cells in vitro. J. Med. Virol. 1999; 57: 238–242.
- Basavannacharya C., Vasudevan S.G. Suramin inhibits helicase activity of NS3 protein of dengue virus in a fluorescence-based high throughput assay format. Biochem Biophys Res Commun 2014; 453: 539–544.
- Wang Y., Qing J., Sun Y., Rao Z. Suramin inhibits EV71 infection Antivir Res 2014; 103: 1–6.
- Ellenbecker M., Lanchy J.-M., Lodmell J.S. Inhibition of Rift Valley fever virus replication and perturbation of nucleocapsid-RNA interactions by suramin. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 7405–7415.
- Ho Y.-J., Wang Y.-M., J.-W. Lu J.-W. et al. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Entry and Transmission. PLoS One. 2015; 10: e0133511.
- Kuo S.C., Wang Y.M., Ho Y.J. et al. Suramin treatment reduces chikungunya pathogenesis in mice. Antiviral Res 2016; 134: 89–96.
- Hwu J.R., Gupta N.K., Tsay S.C. et al. Bis(benzofuran-thiazolidinone)s and bis(benzofuran-thiazinanone)s as inhibiting agents for Chikungunya virus. Antiviral Res 2017; 146: 96–101.
- Nothias-Scaglia L.F., Pannecouque C., F. Renucci F. et al. Antiviral activity of diterpene esters on Chikungunya virus and HIV replication. J Nat Prod 2015; 78 (6): 1277–1283.
- Aggarwal M., Kaur R., Saha A. et al. Evaluation of antiviral activity of piperazine against Chikungunya virus targeting hydrophobic pocket of alphavirus capsid protein. Antiviral Res 2017; 146: 102–111.
- Crance J.M., Scaramozzino N., Jouan A., Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. Antiviral Res 2003; 58 (1): 73–79.
- Briolant S., Garin D., Scaramozzino N. et al. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. Antiviral Res 2004; 61 (2): 111–117.
- Leyssen P., de Clercq E., Neyts J. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. Molecular Pharmacology. 2006; 69(4): 1461–1467.
- Lamballerie X., Ninove L., Charrel R.N. Antiviral treatment of Chikungunya virus infection. Infectious Disorders — Drug Targets 2009; 9 (2): 101–104.
- Rada B., Dragun M. Antiviral action and selectivity of 6 azauridine. Ann New York Acad Sci 1977; 284: 410–417.
- Preston S.L., Drusano G.L., Glue P. et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2451–2456.
- Ravichandran R., Manian M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. J Infect Develop Countr 2008; 2: 2: 140–142.
- Caglioti C., Lalle E., Castilletti C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. New Microbiol 2013; 36: 211–227.
- Bréhin A.-C., Casadémont I., Frenkiel M.-P. et al. The large form of human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS3) exerts antiviral effect against Chikungunya virus. Virology 2009; 384 (1): 216–222.
- Gad H., Paulous S., Belarbi E. et al. The E2-E166K substitution restores Chikungunya virus growth in OAS3 expressing cells by acting on viral entry. Virology 2012; 434 (1): 27–37.
- Varghese F.S., Thaa B., Amrun S.N. et al. The antiviral alkaloid berberine reduces Chikungunya virus-induced mitogen-activated protein kinase signaling. J Virol 2016; 90: 9743–9757.
- Parker W.B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. Virus Res 2005; 107: 165–171.
- Gallegos K.M., Drusano G.L., Argenio D.Z.D., Brown A.N. Chikungunya virus: In Vitro response to combination therapy with ribavirin and interferon alfa 2a. J Infect Dis 2016; 214 (8): 1192–1197.
- Scagnolari C., Caputo B., Rezza G., Antonelli G. Antiviral activity of the combination of interferon and ribavirin against Chikungunya virus: Are the Results Conclusive? Infect Dis 2017; 215 (3): 492–493.
- Delang L., Segura Guerrero N., Tas A. et al. Mutations in the Chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. J Antimicrob Chemother 2014; 69 (10): 2770–2784.
- Bassetto M., de Burghgraeve T., Delang L. et al. Computer-aided identification, design and synthesis of a novel series of compounds with selective antiviral activity against Chikungunya virus. Antiviral Research 2013; 98 (1): 12–18.
- Parashar D., Cherian S. Antiviral perspectives for Chikungunya virus. Biomed Res Int 2014; 631–642.
- Gigante A., Gómez-SanJuan A., Delang L. et al. Antiviral activity of [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones against Chikungunya virus targeting the viral capping nsP1. Antiviral Res 2017; 144: 216–222.
- Ehteshami M., Tao S., Zandi K. et al. Characterization of β -d- N 4-Hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of Chikungunya Virus. Antimicrob. Agents Chemother 2017; 61(4): e02395–16.
- Delogu I., Pastorino B., Baronti C. et al. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. Antiviral Res 2011; 90 (3): 99–107.
- Kaur V., Thiruchelvan M., Lee R.C.H. et al. Inhibition of Chikungunya virus replication by Harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57 (1): 155.
- Dash P.K., Tiwari M., Santhosh S.R. et al. RNA interference mediated inhibition of Chikungunya virus replication in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 2008; 376 (4): 718–722.

52. Parashar D., Paingankar M.S., Kumar S. et al. Administration of E2 and NS1 siRNAs inhibit Chikungunya virus replication in vitro and protects mice infected with the virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013; 7 (9): e2405.
53. Couderc T., Khandoudi N., Grandadam M. et al. Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2009; 200 (4): 516–523.
54. Suhrbier A. Arthritogenic alphaviruses-an overview A. Suhrbier, M.C. Jaffar-Bandjee, P.Gasque *Nature Reviews. Rheumatology*. 2012; 8 (7): 420–429.
55. Harrison V.R., Binn L.N., Randall R. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines prepared in avian and mammalian tissues. *Am J Tropical Med Hygiene* 1967; 16 (6): 786–791.
56. White A., White A., Berman S., Lowenthal J.P. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines propagated in monkey kidney monolayers and chick embryo suspension cultures. *App Microbiol* 1972; 23 (5): 951–952.
57. Eckels K.H., Harrison V.R., Hetrick F.M. Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-ether extraction. *App Microbiol* 1970; 19 (2): 321–325.
58. Nakao E., Hotta S. Immunogenicity of purified, inactivated Chikungunya virus in monkeys. *Bull World Health Organizat* 1973; 48 (5): 559–562.
59. Gardner J., Anraku I., Le T.T. et al. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J Virology* 2010; 84 (16): 8021–8032.
60. Plante K., Wang E., Partidos C.D. et al. Novel Chikungunya vaccine candidate with an ires-based attenuation and host range alteration mechanism. *PLoS Pathogens*. 2011; 7 (7): e1002142.
61. Wang E., Volkova E., Adams A.P. et al. Chimeric alphavirus vaccine candidates for Chikungunya. *Vaccine*. 2008; 26(39): 5030–5039.
62. Mallilankaraman K., Shedlock D.J., Bao H. et al. A DNA vaccine against Chikungunya virus is protective in mice and induces neutralizing antibodies in mice and nonhuman primates. *PLoS Neglected Trop Dis* 2011; 5 (1): e928.
63. Szabó T.G., Palotai R., Antal P. et al. Critical role of glycosylation in determining the length and structure of T cell epitopes. *Immunome Res* 2009; 5 (1): 4.
64. Wang D., Suhrbier A., Penn-Nicholson A. et al. A complex adenovirus vaccine against Chikungunya virus provides complete protection against viraemia and arthritis. *Vaccine* 2011; 29 (15): 2803–2809.
65. Kumar M., Sudeep A.B., Arankalle V.A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine* 2012; 30 (43): 6142–6149.
66. Kramer R.M., Zeng Y., Sahni N. et al. Development of a stable virus-like particle vaccine formulation against Chikungunya virus and investigation of the effects of polyanions. *J Pharm Sci* 2013; 102 (12): 4305–4314.
67. Khan M., Dhanwani R., Rao P.V. et al. Subunit vaccine formulations based on recombinant envelope proteins of Chikungunya virus elicit balanced Th1 Th2 response and virus-neutralizing antibodies in mice. *Virus Research* 2012; 167 (2): 236–246.
68. Chu H., Das S.C., Fuchs J.F. et al. Deciphering the protective role of adaptive immunity to CHIKV IRES a novel candidate vaccine against Chikungunya in the A129 mouse model. *Vaccine* 2013; 31 (33): 3353–3360.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад. <http://orcid.org/0000-0001-6732-8404>

Щукина Вероника Николаевна — к. б. н., научный сотрудник, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-

исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад. <http://orcid.org/0000-0002-5461-3641>

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, член-корр. РАН РФ, начальник института, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад. <http://orcid.org/0000-0002-0843-9427>

Памяти А. А. Фирсова 1945–2020

In Memory of A. A. Firsov
1945–2020



Редколлегия и редакционный совет журнала «Антибиотики и химиотерапия» с глубоким пригорбием сообщают о том, что ушёл из жизни видный учёный в области антибиотиков и химиотерапии — член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук Фирсов Александр Алексеевич.

Область научных интересов А. А. Фирсова охватывала такие важнейшие проблемы, как фармакокинетика и фармакодинамика антимикробных препаратов.

Александр Алексеевич был авторитетным специалистом с мировым именем, его исследования отличала оригинальность подхода и тщательность методов при проведении фармакокинетических исследований, глубина анализа полученных результатов и нестандартность выводов. Его научное наследие огромно, опубликовано более 500 научных статей, монографии и методические рекомендации. Александр Алексеевич был зам. главного редактора нашего журнала. Отечественная наука об антибиотиках понесла тяжёлую невосполнимую

утрату. Хочется надеяться, что оригинальные идеи и неосуществленные планы А. А. Фирсова получат свое развитие и внедрение в работах его коллег и учеников.

Александр Алексеевич запомнится нам не только как выдающийся и авторитетный учёный, но также как яркая незаурядная личность и отзывчивый к проблемам других человек, всегда готовый прийти на помощь в трудную минуту. Его увлечённость, интеллект, тонкий юмор, умение работать с молодёжью делали общение с ним лёгким, интересным и незабываемым.

Все, кому посчастливилось встретить на своем пути Александра Алексеевича, всегда будут вспоминать его с благодарностью и теплотой.

Редколлегия, редакционный совет и редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия» выражают глубокое соболезнование родным и близким Александра Алексеевича Фирсова и вместе с ними скорбят о его безвременной кончине.

Научный путь члена-корреспондента РАН, профессора А. А. Фирсова

Ю. А. ПОРТНОЙ, М. В. ГОЛИКОВА

ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

The scientific path of Corresponding Member of the RAS, Professor A. A. Firsov

Y. A. PORTNOY, M. V. GOLIKOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Александр Алексеевич Фирсов родился в Москве 15 декабря 1945 г. В 1968 г. окончил Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова по специальности «Химия». С 1970 г. он занялся изучением фармакологии антибиотиков во Всесоюзном НИИ антибиотиков (ВНИИА), где проработал более 20 лет, начав свой путь инженером и пройдя все промежуточные ступени карьерной лестницы до заведующего лабораторией. За этот же период им были написаны и защищены кандидатская и докторская диссертации. Удивительная работоспособность, отличная память, чёткое логическое мышление и умение работать с источниками литературы позволили ему быстро стать одним из ведущих специалистов в области фармакокинетики лекарственных препаратов. Уже в 1980 г. была издана первая в СССР книга (руководство) по фармакокинетике, одним из ключевых авторов которой был Александр Алексеевич. Далее последовали монографии, посвящённые фармакокинетическим методам в биофармации, а также фармакокинетическим подходам к оптимизации антибиотикотерапии [1–3]. Александр Алексеевич разработал оригинальные методы определения зависимости токсических эффектов антибиотиков от их концентрации в динамике, провёл детальное изучение особенностей фармакокинетики антибиотиков у новорождённых и детей раннего возраста, а также у больных с хронической почечной недостаточностью в условиях экстракорпорального кровообращения. Он впервые применил множественный корреляционный анализ «факторов больного» для индивидуализации режимов антибиотикотерапии, обосновал и успешно апробировал упрощённые схемы терапевтического мониторинга при лечении амиклозидами.

Во ВНИИА Александр Алексеевич стал кандидатом биологических наук в 1976 г, а в 1990 г. защитил докторскую диссертацию. Ещё во время работы во ВНИИА Александр Алексеевич заинтересовался новым перспективным направлением фармакологии, а именно: изучением фармакодинамики антибиотиков *in vitro* при помощи ди-

намических систем, в которых воспроизводились фармакокинетические профили препаратов, реализуемые у человека. Это направление постепенно стало основным в его научной деятельности и в 1991 г. Александр Алексеевич возглавил вновь организованную лабораторию фармакокинетики в Институте биотехнологии, позднее — НТЦ «Лекбиотех», где были проведены оригинальные работы по фармакокинетическому/фармакодинамическому моделированию с использованием динамических систем. Это были годы интересной творческой работы, время проб и ошибок, время поиска своей ниши в этих исследованиях, количество которых стремительно росло во многих ведущих странах мира. Каждый год из стен лаборатории по данной тематике выходило по несколько статей, которые публиковались ведущими зарубежными журналами, находящимися (как теперь стало важным) в 1-м квартиле списка библиографических баз данных [4–13]. Именно в эти годы возникло тесное сотрудничество с единомышленниками, занимающимися той же проблемой — с лабораторией Университета Брауна (США) под руководством проф. С. Зиннера, совместная работа с которым продолжается и в настоящее время.

В 2001 г., когда Институт биотехнологии прекратил свое существование, часть лаборатории фармакокинетики, благодаря содействию члена-корреспондента РАН Ю.Н. Дудника, директора НИИ по изысканию новых антибиотиков РАН (НИИНА), продолжила исследования по своей тематике в этом институте. Диапазон проводимых исследований резко расширился. Если до этого времени изучалось действие антибиотиков на общую популяцию микроорганизмов, то в НИИНА началось исследование процессов роста резистентности бактерий в процессе антибиотикотерапии. Методами комплексного фармакокинетико-фармакодинамического моделирования была впервые установлена взаимосвязь между селекцией резистентных бактерий и концентрацией антибиотиков и разработаны общие принципы «антимутантной» антибиотикотерапии. Две прорывные статьи на эту

тему, изданные в 2003 г. [14, 15], по данным «Web of Science», зарубежные коллеги процитировали к настоящему моменту более 150 и 70 раз, соответственно. А в целом за свою научную жизнь Александр Алексеевич стал автором более чем 500 научных публикаций, в числе которых 2 монографии в сборниках, вышедших в зарубежных издательствах и посвящённых исследованиям с использованием динамических систем [16, 17]. Работы лаборатории были поддержаны грантами Президиума РАН (2014–2017 гг.) и Российского научного фонда (2014–2016 гг. и 2018–2020 гг.). Александр Алексеевич продолжал заниматься и вопросами изучения фармакокинетики лекарственных препаратов. При его непосредственном участии были разработаны «Методические рекомендации по проведению исследований биоэквивалентности лекарственных средств», а также «Правила проведения доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств» [18, 19].

Кроме научных исследований Александр Алексеевич вёл большую научно-организационную работу в качестве заместителя директора (2004–2007 г.), директора (2007–2017 гг.), а с 2017 г. — научного руководителя ФГБНУ «НИИНА».

За научные заслуги в 1993 г. Александр Алексеевич получил звание профессора, а в 2011 г. был избран членом-корреспондентом Российской академии наук.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика (руководство). Медицина, М.: 1980.
2. Фирсов А.А., Пиотровский В.К. Фармакокинетические методы в биофармации: оценка биодоступности и пресистемная элиминация лекарственных средств. Итоги науки и техники ВИНТИ, Т. 14, ВИНТИ, М.: 1984. — С. 113–223.
3. Фирсов А.А., Назаров А.Д., Черных В.М. Фармакокинетические подходы к оптимизации антибиотикотерапии. Итоги науки и техники ВИНТИ. 1989. — Т. 17.
4. Firsov A. A., Savarino D., Ruble M., Gilbert D., Manzano B., Medeiros A. A., Zinner S. H. Predictors of effect of ampicillin-sulbactam against TEM-1 β -lactamase-producing *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model: enzyme activity versus MIC. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 734–738.
5. Firsov A. A., Ruble M., Gilbert D., Savarino D., Manzano B., Medeiros A. A., Zinner S. H. Net effect of inoculum size on antimicrobial action of ampicillin-sulbactam: studies using an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 7–12.
6. Firsov A. A., Mattie. Relationships between antimicrobial effect and area under the concentration-time curve as a basis for comparison of modes of antibiotic administration: meropenem bolus injections versus continuous infusions. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 352–56.
7. Firsov A. A., Shevchenko A. A., Vostrov S. N., Zinner S. H. Inter- and intraquinolone predictors of antimicrobial effect in an *in vitro* dynamic model: new insight into a widely used concept. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 659–665.
8. Firsov A. A., Vostrov S. N., Shevchenko A. A., Zinner S. H., Cornaglia G., Portnoy Y. A. MIC-based interspecies prediction of the antimicrobial effects of ciprofloxacin on bacteria of different susceptibilities in an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2848–2852.
9. Firsov A. A., Vostrov S. N., Shevchenko A. A., Portnoy Y. A., Zinner S. H. A new approach to *in vitro* comparisons of antibiotics in dynamic models: equivalent area under the curve /MIC breakpoints and equiefficient doses of trovafloxacin and ciprofloxacin against bacteria of similar susceptibilities. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2841–2847.
10. Firsov A. A., Vostrov S. N., Kononenko O. V., Zinner S. H., Portnoy Y. A. Prediction of the effects of inoculum size on the antimicrobial action of trovafloxacin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 498–502.
11. Firsov, A. A., Lubenko I. Y., Portnoy Y. A., Zinner S. H., Vostrov S. N. Relationships of the area under the curve/MIC ratio to different integral endpoints of the antimicrobial effect: Gemifloxacin pharmacodynamics in an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 927–931.
12. Firsov A. A., Zinner S. H. Use of modeling techniques to aid in antibiotic selection. Curr Infect Dis Rep 2001; 3: 35–43.
13. Zinner, S. H., Firsov A. A., Gilbert, D., Simmons K., Lubenko I. Y. The pharmacodynamics of gatifloxacin and ciprofloxacin for pneumococci in an *in vitro* dynamic model: Prediction of equiefficient doses. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 821–826.
14. Firsov, A. A., Vostrov S. N., Lubenko I. Y., Drlica K., Portnoy Y. A., Zinner S. H. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1604–1613.
15. Zinner S. H., Lubenko I. Y., Gilbert D., Simmons K., Zhao X., Drlica K., Firsov A. A. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 616–622.
16. Firsov A. A., Zinner S. H., Lubenko I. Y. *In vitro* dynamic models as tools to predict antibiotic pharmacodynamics. In: Nightingale C. H., Ambrose P. G., Drusano G. L., Murakawa T.; editors. Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice, 2nd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2007; 45–78.
17. Firsov A. A., Portnoy Y. A., Zinner S. H. PK/PD-based prediction of «antimutant» antibiotic exposures using *in vitro* dynamic models. In: Fong I. W., Shlaes D., Drlica K.; Editors. Antimicrobial Resistance in the 21st Century. 2nd ed. Springer International Publishing; 2018; 643–666.
18. Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания. Под ред. В.Г.Кукеса, В.П.Жердева, А.К.Стародубцева. М.: 2004.
19. Фирсов А.А., Жердев В.П., Портной Ю.А., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Барманова Е.Ю. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств. Под ред. А.Н.Миронова. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. — Т. 1. — С. 845–855.

Исследования А. А. Фирсова получили признание и за рубежом. Он являлся членом Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным болезням, Британского общества по антимикробной терапии, членом редколлегий журналов «Journal of Chemotherapy», «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия» и «Фармакокинетика и фармакодинамика», зам. главного редактора журнала «Антибиотики и химиотерапия». Рецензировал работы для журналов «Antimicrobial Agents and Chemotherapy», «Journal of Antimicrobial Chemotherapy», «Clinical Pharmacokinetics», «Journal of Infection», «Expert Opinion, Drugs in Research & Development» и «Journal of Pharmacy & Pharmacology», а также для Национальных институтов здоровья США (National Institutes of Health). Каждый год участвовал в международных конгрессах и конференциях, где часто выступал с устными докладами. Неоднократно работал в качестве приглашённого профессора в ведущих университетах Америки и Западной Европы, в том числе в Торонтском университете (Канада, 1989), Университете Брауна (США, 1993, 1996–2001 гг.), Гарвардском университете (США, 2002, 2004, 2006, 2009 гг.), Лейденском университете (Нидерланды, 1993, 1995 гг.), Университете Вероны (Италия, 1994, 1995, 1997 гг.).

Тяжёлая болезнь оборвала жизнь этого выдающегося учёного и замечательного человека, но его идеи продолжают развиваться в работах его учеников и коллег.

