

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 63



1-2'2018

Научно-практический журнал

Как сократить применение антибиотиков

Избыточное применение антибиотиков приводит к повышению устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, увеличению риска связанных с применением антибиотиков побочных эффектов и более высоким расходам на лечение. Мониторинг антибиотиков под контролем **прокальцитонина (B-R-A-H-M-S PCT™)** позволяет **сократить назначение антибиотиков** и применять их только для пациентов с подтвержденной бактериальной инфекцией, **оптимизировать продолжительность терапии** антибиотиками для каждого пациента, а также значительно снизить **потребление антибиотиков** без неблагоприятного влияния на результаты лечения.

B-R-A-H-M-S PCT платформы

• Дополнительная информация: thermoscientific.com/procalcitonin



Количество дней АБ терапии
без применения алгоритмов
мониторинга уровня ПКТ

-23%
Дней АБТ при Сепсисе¹

-35%
Дней АБТ при ИНДП²



Автоматические чувствительные платформы

B-R-A-H-M-S PCT™ sensitive KRYPTOR™
 ADVIA Centaur® B-R-A-H-M-S PCT™
 ELECSYS® B-R-A-H-M-S PCT™
 LIAISON® B-R-A-H-M-S PCT™ II GEN
 Lumipulse® G B-R-A-H-M-S PCT™
 VIDAS® B-R-A-H-M-S PCT™

Полуавтоматические платформы

B-R-A-H-M-S PCT™ LIA

ПКТ у постели больного

B-R-A-H-M-S PCT-Q™
 Samsung IB B-R-A-H-M-S PCT™

Контактная информация

ЗАО «Термо Фишер Сайентифик» 141400,
 Московская обл., г. Химки
 ул. Ленинградская, вл. 39, стр. 6
 Химки Бизнес Парк
 тел. +7 (495) 739-76-41
 факс +7 (495) 739-76-42
info.btd.moscow@thermofisher.com

1. Bouadma L et al. Lancet 2010, 375 (9713): 463-474 2. Schuetz P et al. Expert Rev Anti Infect Ther 2010, 8 (5): 575-87.

© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. Все права защищены. B-R-A-H-M-S PCT and all other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. ADVIA Centaur® is a registered and protected trademark belonging to Siemens Healthcare Diagnostics. ADVIA Centaur® B-R-A-H-M-S PCT is a product of Siemens Healthcare Diagnostics licensed from Thermo Fisher Scientific. Elecsys® is a registered and protected trademark belonging to Roche or one of its subsidiaries. Elecsys® B-R-A-H-M-S PCT is a product of Roche licensed from Thermo Fisher Scientific. LIAISON® is a registered and protected trademark belonging to DiaSorin S.p.A. LIAISON® B-R-A-H-M-S PCT II GEN is a product of DiaSorin S.p.A. licensed from Thermo Fisher Scientific. Lumipulse® is a registered trademark of Fujirebio Inc. in Japan and in other countries. Lumipulse® G B-R-A-H-M-S PCT is a product of Fujirebio Inc. licensed from Thermo Fisher Scientific. Samsung IB B-R-A-H-M-S PCT is a product of Samsung C&T Corporation licensed from Thermo Fisher Scientific. VIDAS® is a registered trademark of bioMérieux S.A. or one of its subsidiaries. VIDAS® B-R-A-H-M-S PCT is a product of bioMérieux licensed from Thermo Fisher Scientific. KRYPTOR is a registered trademark of CIS bio international, licensed for use by B-R-A-H-M-S, a part of Thermo Fisher Scientific. Продукция компании Thermo Fisher Scientific представлена во всем мире; не все предназначения и способы использования, указанные в данной публикации, зарегистрированы во всех странах.



Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

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

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2018

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: 2018

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 63

1—2'2018

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Оригинальные статьи

Original Papers

Принцевская С. С., Королев А. М., Лузиков Ю. Н.,
Мирчинк Е. П., Исакова Е. Б., Тевяшова А. Н.
Синтез и антибактериальная
активность 11-О-(бензоксаборол-аминоалкилкарбамоил)
производных макролидного антибиотика азитромицина

3 Printsevskaya S. S., Korolev A. M., Luzikov Yu. N.,
Mirchink E. P., Isakova E. B., Tevyashova A. N.
Synthesis and Antibacterial Activity
of 11-O-(Benzoxaborole-Aminoalkylcarbamoyl) Derivatives
of Macrolide Antibiotic Azithromycin

Альмяшева Н. Р., Голышкин А. В.,
Зиангирова М. Ю., Петрова Д. А., Краснопольская Л. М.
Продукция липолитических ферментов
ксилотрофными грибами отдела *Basidiomycetes*

8 Almyasheva N. R., Golyshkin A. V., Ziangirova M. Y.,
Petrova D. A., Krasnopol'skaya L. M.
Production of Lipolytic Enzymes
by Xylotrophic *Basidiomycetes*

Гулий О. И., Караваяева О. А., Ларионова О. С.,
Ларионов С. В., Ловцова Л. Г., Усков К. Ю., Бунин В. Д.
Оценка воздействия бактериофагов на микробные клетки
методом электрооптического анализа

14 Guliy O. I., Karavaeva O. A., Larionova O. S.,
Larionov S. V., Lovtsova L. G., Uskov K. Yu., Bunin V. D.
Electro-optical Analysis of the Effects
of Bacteriophages on Microbial Cells

В помощь практикующему врачу

Guidelines for Practitioners

Богущ Т. А., Стенина М. Б., Богущ Е. А.,
Заркуа В. Т., Калюжный С. А., Мамичев И. А.,
Тюляндина А. С., Тюляндин С. А.
Количественные показатели экспрессии ERCC
в ткани серозного рака яичников и эффективность
I линии химиотерапии с включением препаратов платины

24 Bogush T. A., Stenina M. B., Bogush E. A.,
Zarkua V. T., Kalyuzhny S. A., Mamichev I. A.,
Tyulyandina A. S., Tyulyandin S. A.
The Quantitative Indices of ERCC1 Expression
in Serous Ovarian Cancer Tissue and the Efficacy
of First-Line Platinum-Based Chemotherapy

Лазарева Н. Б., Журавлева М. В.,
Прокофьев А. Б., Ших Е. В.
Потенциальные возможности мониторинга концентрации
прокальцитонина при проведении антибактериальной
терапии инфекций нижних дыхательных путей

32 Lazareva N. B., Zhuravleva M. V.,
Prokofiev A. B., Shikh E. V.
Potential Possibilities of Monitoring
the Procalcitonin Concentration During Antibacterial Therapy
of Lower Respiratory Tract Infections

Парфенов С. А., Боровков Е. Ю., Шагвалиев А. Г.,
Тучин И. А., Белов В. Г., Парфенов Ю. А.
Современные направления профилактики
внебольничной пневмонии у военнослужащих,
проходящих военную службу по призыву

38 Parfenov S. A., Borovkov E. Yu., Shagvaliev A. G.,
Tuchin I. A., Belov V. G., Parfenov Yu. A.
Modern Directions of Prophylaxis of Community-Acquired
Pneumonia Among Soldiers Undergoing Military Service
on Conscription

Обзоры

Reviews

Андрюков Б. Г., Запорожец Т. С., Беседнова Н. Н.
Перспективные стратегии поиска новых средств борьбы
с инфекционными заболеваниями

44 Andryukov B. G., Zaporozhets T. S., Besednova N. N.
Perspective Strategies for Finding New Means
of Fighting with Infectious Diseases

Белов Б. С., Буханова Д. В., Тарасова Г. М.
Вакцинация в ревматологии: настоящее и будущее

56 Belov B. S., Bukhanova D. V., Tarasova G. M.
Vaccination In Rheumatology: Present And Future

* 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.

Синтез и антибактериальная активность 11-О-(бензоксаборол-аминоалкилкарбамоил) производных макролидного антибиотика азитромицина

С. С. ПРИНЦЕВСКАЯ¹, А. М. КОРОЛЕВ¹, Ю. Н. ЛУЗИКОВ¹,
Е. П. МИРЧИНК¹, Е. Б. ИСАКОВА¹, *А. Н. ТЕВЯШОВА^{1,2}

¹ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

² Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

Synthesis and Antibacterial Activity of 11-O-(Benzoxaborole-Aminoalkylcarbamoyl) Derivatives of Macrolide Antibiotic Azithromycin

S. S. PRINTSEVSKAYA¹, A. M. KOROLEV¹, YU. N. LUZIKOV¹, E. P. MIRCHINK¹, E. B. ISAKOVA¹, A. N. TEVYASHOVA^{1,2}

¹ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

² D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Бензоксаборол, привилегированная структура в медицинский химии благодаря своим физико-химическим и биологическим свойствам, был использован для синтеза гибридных антибиотиков на основе азитромицина, в которых бензоксаборол был присоединен к 11-гидроксильной группе азитромицина через аминоалкилкарбамоильный спейсер. Полученные новые гибридные антибиотики 5–7 продемонстрировали широкий спектр антибактериальной активности, особенно в отношении чувствительного штамма *S. pneumoniae*, однако исследованная модификация не привела к преодолению устойчивости к антибиотикам у штаммов MRSA.

Ключевые слова: азитромицин, бензоксаборол, макролидные антибиотики, антибактериальная активность.

Benzoxaborole, a structure in medicinal chemistry privileged due to its desirable physicochemical and drug-like properties, was used for the synthesis of azithromycin-benzoxaborole conjugates in which benzoxaborole fragment was attached to the 11-hydroxy group of the antibiotic via aminoalkylcarbamoyl spacer. The obtained hybrids 5–7 demonstrated wide spectrum of antibacterial activity, especially against susceptible *S. pneumoniae* strain although the investigated modification didn't result in overcoming bacterial resistance in MRSA.

Keywords: azithromycin; benzoxaborole; macrolide antibiotics; antibacterial activity.

Введение

Хотя бензоксаборолы были впервые описаны Torssell в 1957 г. [1], их применение в медицинской химии началось только с 2006 г., когда было показано, что 5-фторбензоксаборол (AN2690) проявляет противогрибковую активность за счёт ингибирования лейцил-тРНК (LeuRS) синтетазы грибов [2]. В ходе дальнейших исследований было установлено, что бензоксаборолы обладают широким спектром биологической активности, включая антибактериальную [3], противовирусную [4], антипаразитарную и противовоспалительную [5]. Препарат AN2690, разрабатываемый фирмой Anacor Pharmaceuticals (поглощённой компанией Pfizer в 2016 г.), в 2014 г. был одобрен FDA для лечения онихомикозов.

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 119021, г. Москва, ул. Б. Пироговская, 11, стр. 1. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе.
E-mail: chulis@mail.ru

Кроме того, бензоксаборолы были успешно использованы для синтеза новых типов гибридных молекул, в том числе, гибридных антимикробных и антипаразитарных агентов (антибиотики двойного действия) [6–8].

Целью настоящей работы являлся синтез новых гибридных антибиотиков на основе азитромицина и бензоксаборолов и изучение спектра их антибактериального действия. Ранее азитромицин был использован для получения различных серий гибридных антибиотиков, включая гибриды на основе азитромицина и фторхинолов (макролоны), описанные в работах GlaxoSmithKline и Pliva [9–13]. Недавно в нашей группе были получены гибридные антибиотики на основе бензоксаборолов и кларитромицина, обладающие высокой антибактериальной активностью в отношении грамположительных штаммов [14].

Механизм действия макролидных антибиотиков связан с ингибированием синтеза белка в мик-

робной клетке за счёт взаимодействия антибиотика с V-доменом 23S рРНК в пептидил-трансферазном сайте рибосомы. Наиболее часто встречающиеся механизмы устойчивости к макролидам включают активный транспорт антибиотика из бактериальной клетки и модификацию мишени путём метилирования 23S рРНК или мутаций генов, кодирующих 23S рРНК или рибосомальные белки [15].

Ранее было показано, что модификация азитромицина по 4 и/или 11 положению приводит к производным, активным в отношении штаммов, устойчивых к эритромицину, в особенности, в отношении штаммов *Streptococcus pneumoniae*, устойчивых к эритромицину [16].

Таким образом, целью настоящей работы являлся синтез производных азитромицина, в которых остаток бензоксаборола присоединён через спейсер к 11-положению макролидного антибиотика.

Материал и методы

За ходом реакций наблюдали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием Merck Silica Gel 60F254 пластинок. Флэш-хроматографию проводили на силикагеле Merck silica gel 60. Инфракрасные спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «Nicolet-iS10» (детектор DTGS, светоделиитель KBr) с приставкой «Smart Performer» (метод однократного НРВО), оснащённом ZnSe-кристаллом. Спектры регистрировали в диапазоне 3000 — 650 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹ и обрабатывали с использованием программного обеспечения OMNIC-7.0. ЯМР спектры регистрировали на Varian VXR-400 ЯМР-спектрометре (Varian, Пало Альто) с использованием в качестве внутреннего стандарта ТМС. Масс-спектры высокого разрешения при ионизации методом электро-спрей регистрировали на Bruker «micrOTOF-Q II»-MS масс-спектрометре (Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия). Образцы растворяли в смеси ацетонитрил–вода (3:2). Положительно и отрицательно заряженные ионы анализировали при следующих условиях детектирования: напряжение на капилляре 4 kV, давление азота в небулайзере (распылителе) 0,4 Bar (5,8 psi), скорость потока осушающего газа 4,0 л/мин и температура источника 180°C. Инструмент калибровали с помощью 1% калибровочного раствора для ESI (Sigma-Aldrich, Швейцария) в 95% водном AcCN. Точность измерений составляла 0,43 ppm в интервале масс между 118.086255 и 2721.894829. Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ осуществляли на Shimadzu HPLC хроматографе серии LC 10 на колонке Kromasil C-18 (4,6×250 мм), объём пробы 20 мкл с использованием УФ-детектора. Элюцию проводили смесью: А — HCOONH₄ 0,2% (pH 4,2), В — AcCN, градиент ацетонитрила от 20 до 80% от 0 до 30 мин.

11, 12-Циклический карбонат азитромицина (2). К раствору азитромицина (1) (6 г, 5,12 ммоль) в этилацетате добавляли K₂CO₃ (1,6 г, 11,58 ммоль), смесь нагревали до кипения, порциями в течение 30 мин добавляли этилен карбонат (4 г, 45,5 ммоль), затем кипятили смесь с обратным холодильником в течение 24 ч. Удаляли растворитель в вакууме, остаток растворяли в CHCl₃ (100 мл), добавляли воду (100 мл). Разделяли слои, водную фракцию экстрагировали CHCl₃ (2×50 мл). Объединяли органические фракции, промывали H₂O, высушивали над Na₂SO₄ и упаривали досуха в вакууме. R_f=0,25 (CHCl₃/CH₃OH, 6:1); MS (ESI) m/z рассчитано для C₃₉H₇₀N₂O₁₃ 774,4878; найдено (M + H)⁺ 775,4824.

11, 12-Циклический карбонат 2'-О-ацетил азитромицина (3). К раствору 11, 12-циклический карбонат азитромицина (2,0 г,

2,67 ммоль) в CH₂Cl₂ (20 мл) добавляли уксусный ангидрид (0,5 мл, 5,34 ммоль) и Et₃N (1,48 мл, 10,68 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 24 ч при комнатной температуре, затем добавляли 5% раствором NaHCO₃ (20 мл), водную фракцию экстрагировали CH₂Cl₂ (2×10 мл). Объединяли органические фракции, промывали H₂O, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Остаток очищали методом флэш-хроматографии (CH₂Cl₂/CH₃OH, 10:1), фракции, содержащие целевое вещество объединяли, упаривали в вакууме досуха получая 1,5 г (75%) целевого соединения 3 в виде белой пены. R_f=0,6 (CHCl₃/CH₃OH, 6:1); MS (ESI) m/z рассчитано для C₄₁H₇₂N₂O₁₄ 816,4984; найдено (M+H)⁺ 817,5067.

Общий метод получения 11-О-аминоалкилкарбамоил-азитромицина (4). 11, 12-Циклический карбонат 2'-О-ацетил азитромицина (3) (2 г) растворяли в 1, 3-диаминопропане или 1,5-диаминопентане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч, затем добавляли EtOAc (100 мл) и H₂O (100 мл), водную фракцию экстрагировали EtOAc (2×10 мл). Объединяли органические фракции, промывали H₂O, высушивали над Na₂SO₄. Полученные целевые производные без дополнительной очистки использовали на следующей стадии.

Общий метод получения 11-О-(бензоксаборолил-аминоалкил) карбамоил азитромицина (5-7). Раствор соответствующего бензоксаборола (1,5 ммоль) растворяли в ДМФА (4 мл), добавляли 1-гидроксibenзотриазол (HOBt) (330 мг, 1,5 ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (DCC) (375 мг, 1,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 2 ч, затем добавляли 1-О-аминоалкилкарбамоил-азитромицин (4) (660 мг, 0,75 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч, затем добавляли EtOAc (50 мл) и H₂O (50 мл), водную фракцию экстрагировали EtOAc (2×30 мл). Объединяли органические фракции, промывали H₂O, высушивали над Na₂SO₄, концентрировали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюцию проводили CHCl₃ (70 мл), затем смесью CHCl₃-EtOH (10:1) (150 мл), затем смесью CHCl₃-EtOH (3:1). Фракции, содержащие целевое вещество 5—7 объединяли, упаривали в вакууме досуха.

Соединение 5

Белый порошок, выход: 120 мг (15%), T_{пл} 160—162°C. R_f 15.05 мин. ИК: 3322, 2970, 2931, 2874, 1813, 1729, 1651, 1599, 1538, 1455, 1376, 1351, 1258, 1165, 1078, 1046, 1013, 1000, 881, 803, 773, 734 см⁻¹. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ ppm): 7.35 (t, 1H), 7.17 (d, 1H), 7.11 (d, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.91 (d, 1H), 4.49 (d, 1H), 4.41 (d, 1H), 4.30 (s, 1H), 4.10 (t, 1H), 3.58 (m, 2H), 3.29—3.32 (m, 4H), 3.13 (t, 3H), 3.02 (d, 1H), 2.56 (m, 2H), 2.35 (m, 7H), 2.23 (m, 3H), 1.98 (m, 3H), 1.73—1.76 (m, 1H), 1.66 (t, 1H), 1.55 (m, 2H), 1.36—1.17 (m, 15H), 1.13 (m, 2H), 1.09 (d, 3H), 0.99 (d, 2H), 0.86 (t, 2H). ¹³C ЯМР (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 177.07, 174.28, 158.16, 145.99, 131.33, 127.40, 119.46, 104.16, 96.15, 78.81, 78.07, 75.34, 74.30, 73.06, 70.86, 70.73, 69.36, 66.08, 65.76, 62.18, 62.09, 49.77, 45.91, 43.08, 42.46, 40.66, 39.75, 37.82, 36.20, 35.16, 31.71, 29.95, 29.68, 29.55, 29.50, 29.38, 27.56, 27.16, 22.91, 22.30, 21.82, 21.51, 18.21, 14.80, 11.59, 10.70, 10.15. MS (ESI) m/z рассчитано для C₅₂H₈₉BN₄O₁₆ 1036.6367 найдено (M+H)⁺ 1037.6207 (M+H)²⁺ 519.3141.

Соединение 6

Белый порошок, выход: 130 мг (14%), T_{пл} 165—167°C. R_f 15.48 мин. ИК: 33325, 2970, 2933, 2874, 1723, 1703, 1650, 1600, 1549, 1451, 1379, 1258, 1166, 1079, 1047, 1013, 998, 955, 881, 834, 804, 782, 763, 743 см⁻¹. ¹³C ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ ppm): 175.05, 173.28, 157.89, 146.12, 131.30, 127.20, 118.65, 104.10, 95.99, 78.76, 77.85, 75.34, 74.16, 71.97, 70.87, 70.65, 69.44, 67.87, 65.78, 62.16, 61.97, 49.88, 45.87, 43.17, 42.38, 41.11, 37.66, 36.97, 36.70, 35.17, 30.71, 29.97, 29.88, 29.79, 29.67, 28.44, 27.88, 27.43, 25.87, 25.14, 23.17, 22.67, 21.99, 21.77, 18.34, 13.77, 10.99, 10.54, 10.00. MS (ESI) m/z рассчитано для C₅₄H₉₃BN₄O₁₆ 1067.6880 найдено (M+H)⁺ 1065.6651 (M+H)²⁺ 533.3359.

Соединение 7

Белый порошок, выход: 110 мг (13%), T_{пл} 158—160°C. R_f 23.43 мин. ИК: 3345, 2974, 2929 2879, 2874, 1812, 1726, 1644,

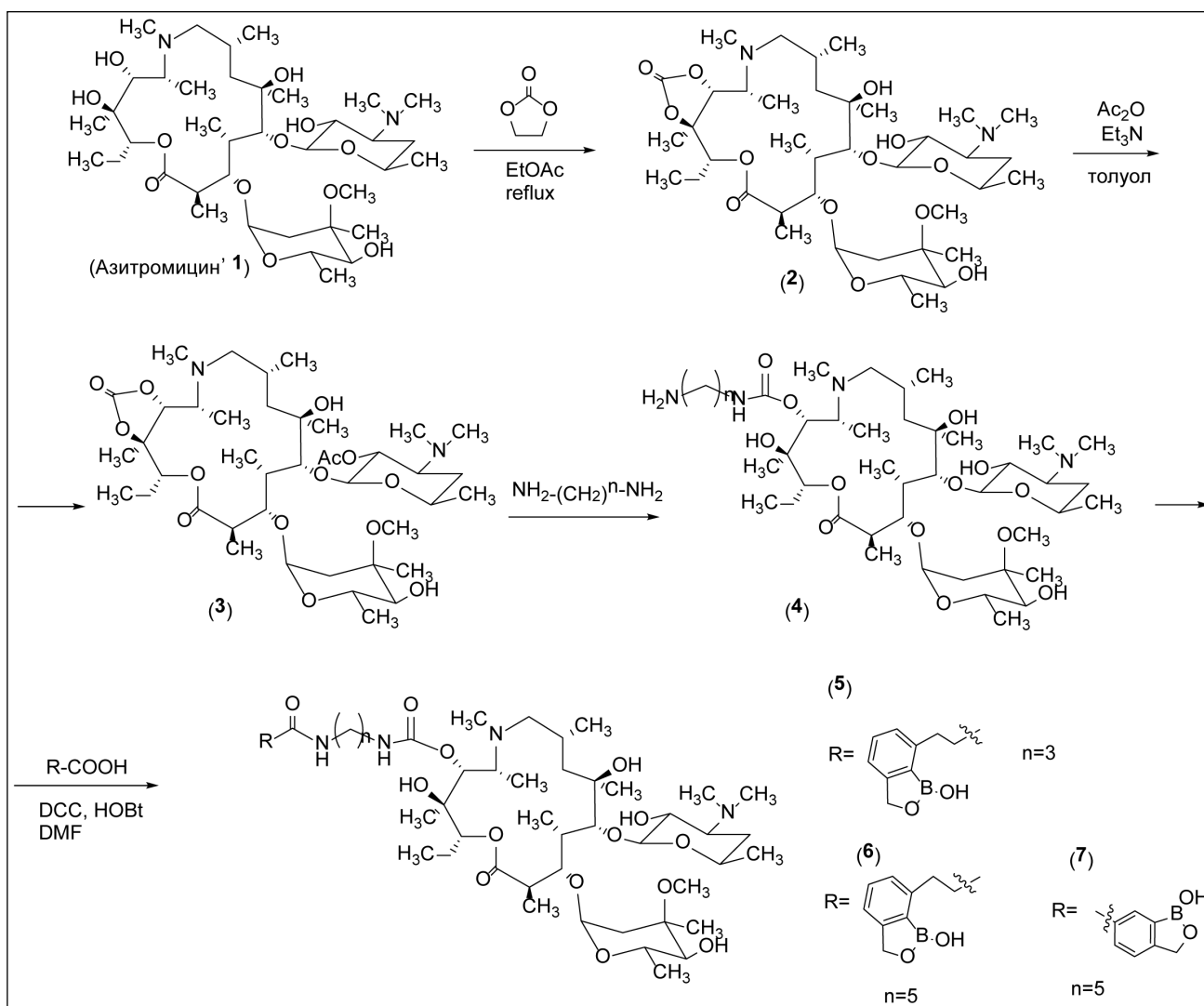


Схема синтеза гибридных антибиотиков 5–7.

1555, 1454, 1322, 1381, 1321, 1272, 1088, 1045, 981, 879, 805, 745 см⁻¹.
¹³C ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ ppm): 177.04, 174.17, 157.20, 146.88, 130.89, 128.01, 118.36, 104.14, 95.89, 78.77, 78.44, 75.14, 74.21, 72.88, 70.52, 70.13, 69.18, 65.97, 65.54, 62.16, 61.86, 49.54, 45.66, 43.02, 42.33, 40.55, 39.14, 36.89, 36.15, 35.00, 31.14, 30.12, 29.66, 29.47, 29.33, 29.31, 27.44, 27.12, 22.88, 22.12, 21.70, 21.51, 18.01, 14.78, 11.62, 10.64, 10.12. MS (ESI) m/z рассчитано для C₅₂H₈₉BN₄O₁₆ 1036.6367 найдено (M+H)⁺ 1037.6231 (M+H)²⁺ 519.3152.

Антибактериальная активность *in vitro*. Антибактериальную активность соединений в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов определяли стандартным методом микроразведений на среде Мюллера–Хинтона (Acumedia, Балтимор, США) [17].

Результаты и обсуждение

Для синтеза целевых соединений 5–7 был использован модифицированный метод, описанный S. Ма и соавт., заключающийся в превращении 4''-замещённых производных азитромицина в 4'',11-ди-замещённые производные взаимодействием 4''-карбамоил-11,12 карбамата азитромицина с аминами в присутствии гидрохлорида пиридина [16].

Взаимодействием азитромицина (1) с этилен карбонатом получен 11,12 циклический карбонат азитромицина (2), 2'-О-гидроксильную группу которого защищали ацетильной группой реакцией с уксусным ангидридом в пиридине (рисунок). Полученное производное 3 вводили в реакцию с 1, 3-диаминопропаном или 1,5-диаминопентаном, что приводило к раскрытию циклического карбоната и одновременному отщеплению 2'-ацетильной группы. Полученное производное 4, содержащее свободную аминогруппу ацилировали бензоксаборолами, содержащими карбоксильную группу в присутствии 1-гидроксибензотриазола (HOBt) и дициклогексилкарбодиимида (DCC). Целевые гибридные антибиотики на основе азитромицина и бензоксаборолов (5–7) очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле.

Чистоту полученных соединений подтверждали методами ТСХ и ВЭЖХ. Структура полученных соединений была подтверждена методами масс-спек-

Изучение антибактериальной активности гибридных антибиотиков (5–7) в сравнении с азитромицином (AZM) и тобрамицином TBR

Штамм	МПК, мг/мл				
	AZM	TBR	5	6	7
Грамположительные					
<i>S.epidermidis</i> 533	8	nt	>32	>32	>32
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	0,5	≤0,06	2	1	4
<i>S.pneumonia</i> ATCC 6301	nt	4	0,12	≤0,06	0,25
<i>S.pneumonia</i> ATCC 49619	4	nt	16	32	>32
<i>S.aureus</i> 10	1	nt	8	4	16
<i>S.aureus</i> ATCC 29213 (MSSA)	1	1	2	2	4
<i>S.aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	>64	>64	>64	>64	>64
<i>S.aureus</i> 3797	>32	nt	>32	>32	>32
<i>S.aureus</i> 10	1	nt	8	4	16
<i>E.faecium</i> 568	8	nt	8	16	>32
<i>E.faecium</i> 569	8	nt	16	16	>32
<i>E.faecalis</i> 560	8	nt	16	16	>32
Грамотрицательные					
<i>B.thailandensis</i> ATCC 700388	>64	nt	>64	>64	>64
<i>B.cepacia</i> ATCC 25416	64	8	>64	>64	>64
<i>P.multocida</i> ATCC 11039	0,25	2	2	1	2
<i>M.haemolytica</i> ATCC 11039	1	4	8	8	32
<i>H.somni</i> ATCC 700025	≤0,12	4	2	1	2
<i>E.coli</i> ATCC 25922 MHB 37	nt	0,5	32	32	64
<i>E.coli</i> ATCC 25922	8	0,5	8	8	8
<i>E.coli</i> K12 tolC:Tn10 ECM1556	nt	0,5	2	2	4
<i>E.coli</i> K12 tolC:Tn10 leuS_A262D	nt	≤0,06	2	2	4
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	64	0,12	>64	>64	>64
<i>P.aeruginosa</i> PAO1d3	0,12	8	32	32	64
<i>A.baumannii</i> ATCC 17978	4	2	>64	>64	>64
<i>H.influenza</i> ATCC 49766	4	0,12	16	16	32

Примечание. nt — не определено.

торметрии ЯМР-спектроскопии. Отнесение сигналов в ¹³C ЯМР спектрах соединений 5–7 осуществляли на основе литературных данных отнесения сигналов в ¹³C ЯМР спектрах азитромицина [18, 19]. ¹³C ЯМР спектры соединений 5–7 содержали все сигналы атомов углерода, соответствующие фрагменту азитромицина, кроме того, в спектрах наблюдали появление следующих сигналов: 156,3–157,3 ppm (соответствующих сигналу карбамоильного атома углерода); 167,6–170,5 (соответствующих сигналу амидного атома углерода); пять сигналов при 25–38 ppm в случае соединений 5 и 7 (соответствующих 5 алифатическим атомам углерода спейсера); три сигнала при 27–34 ppm в случае соединения 6 (соответствующих 3 алифатическим атомам углерода спейсера); сигналы при 67–70 ppm (соответствующих сигналу алифатического атома углерода в бензоксаборольном кольце) и сигналы ароматических атомов углерода при 117–155 ppm.

Изучение антибактериальной активности синтезированных новых гибридных антибиотиков 5–7 проводили на панели грамположительных и грамотрицательных штаммов, полученные данные представлены в таблице.

Установлено, что новые соединения 5–7 проявляют широкий спектр антибактериальной активности, при этом более высокой активностью обладает производное 5 (см. таблицу). Введение бензоксаборольного фрагмента, к сожалению, не приводило к появлению антибактериальной ак-

тивности соединений 5–7 в отношении MRSA (штамм ATCC 33591). Ценной является высокая активность всех полученных соединений 5–7 в отношении *S.pneumonia* ATCC 6301.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки гибридных структур на основе макролидных антибиотиков и бензоксаборолов, в том числе, требуются дополнительные исследования для установления взаимосвязей структура — антибактериальная активность (установление роли структуры и длины спейсера, структуры бензоксаборольного фрагмента и т. д.).

Заключение

Исходя из азитромицина и карбоксил-содержащих бензоксаборолов получена серия гибридных антибиотиков, в которых фрагмент бензоксаборола присоединен к 11-положению макролидного антибиотика через аминоалкилкарбамоильный спейсер. Введение бензоксаборольного фрагмента сохранило высокую активность азитромицина в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов, однако не привело к появлению активности в отношении резистентного штамма MRSA. Ценной является высокая активность всех полученных соединений 5–7 в отношении *S.pneumonia* ATCC 6301.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-60110.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Torssell K.* Arylboronic acids. III. Bromination of Tollyboronic Acids According To Wohl-Ziegler. *Ark Kemi* 1957; 10: 507—511.
2. *Zhang J., Zhu M., Lin Y., Zhou H.* The Synthesis of Benzoxaboroles And Their Applications in Medicinal Chemistry. *Sci China Chem* 2013; 56: 1372—1381.
3. *Xia Y., Cao K., Zhou Y., Alley M.R.K., Rock F., Mohan M., Meewana M., Baker S.J., Lux S., Ding C.Z., Jia G.F., Kullyb M., Plattner J.J.* Synthesis And SARof Novel Benzoxaboroles As a New Class of β -Lactamase Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 2533—2536.
4. *Li X.F., Zhang S.M., Zhang Y.K., Liu Y.D., Charles Z., Zhou Y., Plattner J.J., Baker S.J., Bu W., Liu L., Kazmierski W.M., Duan M.S., Grimes R.M., Wright L.L., Smith G.K., Jarvest R.L., Ji J.J., Cooper J.P., Tallant M.D., Crosby R.M., Creech K., Ni Z.J., Zou W.X., Wright J.* Synthesis and SAR of Acyclic HCV NS3 Protease Inhibitors With Novel P4-Benzoxaborole Moieties. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 2048—2054.
5. *Akama T., Baker S.J., Zhang Y.K., Hernandez V., Zhou H.C., Sanders V., Freund Y., Kimura R., Maples K.R., Plattner J.J.* Discovery and Structure-Activity Study of A Novel Benzoxaborole Anti-Inflammatory Agent (AN2728) For The Potential Topical Treatment of Psoriasis And Atopic Dermatitis. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 2129—2132.
6. *Printsevskaya S.S., Reznikova M.I., Korolev A.M., Lapa G.B., Olsufyeva E.N., Preobrazhenskaya M.N., Plattner J.J., Zhang Y.K.* Synthesis And Study of Antibacterial Activities of Antibacterial Glycopeptides Antibiotics Conjugated With Benzoxaboroles. *Future Med Chem* 2013; 5: 641—652.
7. *Qiao Z.T., Wang Q., Zhang F.L., Wang Z.L., Bowling T., Nare B., Jacobs R.T., Zhang J., Ding D.Z., Liu Y.G., Zhou H.C.* Chalcone-Benzoxaborole Hybrid Molecules As Potent Antitrypanosomal Agents. *J Med Chem* 2012; 55: 3553—3557.
8. *Tevyashova A.N., Korolev A.M., Trenin A.S., Dezhenskova L.G., Shtil A.A., Polshakov V.I., Savelyev O.Y., Olsufyeva E.N.* New Conjugates of Polyene Macrolide Amphoteracin B With Benzoxaboroles: Synthesis And Properties. *J Antibiot (Tokyo)* 2016; 69: 549—560.
9. *Kapic S., Paljetak H.C., Alihodzic S., Antolovic R., Haber E.V., Jarvest R.L., Holmes D.J., Broskey J.P., Hunt E.* 6-Alkylquinolone-3-Carboxylic Acid Tethered To Macrolides Synthesis And Antimicrobial Profile. *Bioorg Med Chem.* 2010; 18: 6569—6577.
10. *Škugor M.M., Štimac V., Palej I., Lugaric D., Paljetak H.C., Filipic D., Modric M., Dilovic I., Gembarovski D., Mutak S., Haber V.E., Holmes D.J., Ivezic-Schoenfeld Z., Alihodzic S.* Synthesis And Biological Activity of 4''-O-Acyl Derivatives of 14- And 15-Membered Macrolides Linked to Ω -Quinolone-Carboxylic Unit. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 6547—6558.
11. *Fajdetic A., Paljetak H.C., Lazarevski G., Hutinec A., Alihodzic S., Derek M., Štimac V., Andreotti D., Sunjic V., Berge J.M., Mutak S., Dumić M., Lociuo S., Holmes D.J., Maršić N., Haber V.E., Spaventi R.* 4''-O-(Ω -Quinolylamino-Alkylamino)Propionyl Derivatives of Selected Macrolides With The Activity Against The Key Erythromycin Resistant Respiratory Pathogens. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 6559—6568.
12. *Jakopovic I.P., Kragol G., Forrest A.K., Frydrych C.S.V., Štimac V., Kapic S., Škugor M.M., Ilijaš M., Paljetak H.C., Jelic D., Holmes D.J., Hickey D.M.B., Verbanac D., Haber V.E., Alihodzic S.* Synthesis And Properties of Macrolones Characterized By Two Ether Bonds in The Linker. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 6578—6588.
13. *Kapic S., Paljetak H.C., Jakopovic I.P., Fajdetic A., Ilija M., Štimac V., Brajša K., Holmes D.J., Berge J., Alihodzic S.* Synthesis of Macrolones With Central Piperazine Ring in The Linker And Its Influence on Antibacterial Activity. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 7281—7298.
14. *Lapa G.B., Mirchink E.P., Isakova E.B., Preobrazhenskaya M.N.* Two Approaches to The Use Of Benzo[C][1,2]oxaboroles As Active Fragments For Synthetic Transformation of Clarithromycin. *J Enzyme Inhibition Med Chem* 2017; 32: 452—456.
15. *Gaynor M., Mankin A.S.* Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Curr Topics Med Chem* 2003; 3: 949—961.
16. *Li X., Ma S., Yan M., Wang Y., Ma S.* Synthesis And Antibacterial Evaluation of Novel 11,4''-Disubstituted Azithromycin Analogs With Greatly Improved Activity Against Erythromycin-Resistant Bacteria. *Europ J Med Chem* 2013; 59: 209—217.
17. NCCLS-The National Committee for Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; NCCLS document M100-S15, USA 2005.
18. *Barber J.* Assignments of The ^{13}C And ^1H NMR Spectra of Azithromycin In CDC13. *Magnet Resonan Chem* 1991; 29: 740—743.
19. *Brennan R.J., Barber J.* Full Assignments of The ^{13}C And ^1H NMR Spectra of Azithromycin in Buffered D $_2$ O And DMSO-D $_6$. *Magnet Resonan Chem* 1992; 30: 327—333.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Принцевская Светлана Сергеевна — к. х. н., с. н. с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Королёв Александр Михайлович — д. х. н., гл. н. с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Лузиков Юрий Николаевич — к. х. н., с. н. с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Мирчинк Елена Павловна — д. м. н., в. н. с. лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Исакова Елена Борисовна — н. с. лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Тевяшова Анна Николаевна — д. х. н., в. н. с. лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», доцент кафедры органической химии Российского химико-технологического университета им. Д. И. Менделеева, Москва

Продукция липолитических ферментов ксилотрофными грибами отдела *Basidiomycetes*

*Н. Р. АЛЪМЯШЕВА^{1,2}, А. В. ГОЛЫШКИН^{1,2}, М. Ю. ЗИАНГИРОВА¹, Д. А. ПЕТРОВА², Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ¹

¹ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

² Российский государственный университет нефти и газа им. И. М. Губкина, Москва

Production of Lipolytic Enzymes by Xylotrophic *Basidiomycetes*

N. R. ALMYASHEVA^{1,2}, A. V. GOLYSHKIN^{1,2}, M. Y. ZIANGIROVA¹, D. A. PETROVA², L. M. KRASNOPOLSKAYA¹

¹ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

² Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Moscow

В результате изучения 20 штаммов ксилотрофных базидиальных грибов отобраны 2 штамма — *Trametes versicolor* 1 и *Hericium erinaceus* 0912, способные продуцировать липолитические ферменты на плотных питательных средах и в погруженной культуре. Наибольшая липолитическая активность штамма *T.versicolor* была отмечена на среде, содержащей олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт, штамма *H.erinaceus* 0912 — на среде с олеиновой кислотой, соевой мукой и кукурузным экстрактом. При погруженном культивировании *H.erinaceus* накапливал максимальное количество липолитических ферментов в культуральной жидкости через 120 ч, *T.versicolor* — через 36 ч. Белковые компоненты культуральной жидкости базидиомицетов были осаждены сульфатом аммония и диализованы, после чего ферментные препараты липаз были выделены методом гель-фильтрации. Масса препарата липолитических ферментов, выделенных из культуральной жидкости *H.erinaceus* 0912, в 5,5 раз превышала массу препарата из культуральной жидкости *T.versicolor* 1, однако по величине липолитической активности ферментного препарата штамм *H.erinaceus* 0912 (204,55 мУ/мг белка) уступал штамму *T.versicolor* 1 (792,6 мУ/мг белка).

Ключевые слова: ксилотрофные базидиальные грибы, липолитические ферменты, активность.

Twenty strains of basidiomycetes were screened for lipolytic activity. Two strains — *Trametes versicolor* 1 and *Hericium erinaceus* 0912 — were able to produce lipolytic enzymes during solid medium and submerged cultivation. Oleic acid and yeast extract were selected as the best carbon and nitrogen sources for *Trametes versicolor* 1, oleic acid, soybean meal and corn steep liquor — for *Hericium erinaceus* 0912. *Hericium erinaceus* 0912 accumulated the maximum amount of lipolytic enzymes in the culture medium after 120 h, *Trametes versicolor* 1 — after 36 h. The culture medium proteins were precipitated by ammonium sulfate and dialyzed, after which the enzyme preparations of lipases were isolated by gel filtration. The weight of the preparation of lipases from *H.erinaceus* 0912 was 5.5 times greater than the weight of the preparation of lipases from *T.versicolor* 1, however the activity of the lipases from *T.versicolor* 1 (792.6 mU/mg protein) was three times higher than that of the lipases from *H.erinaceus* 0912 (204.55 mU/mg protein).

Keywords: basidiomycetes strains, lipolytic enzymes, activity.

Введение

Липазы (триацилглицерин гидролазы, К.Ф.3.1.1.3.) — класс ферментов, осуществляющих гидролиз ацилглицеридов до глицерина и свободных жирных кислот, а также синтетические реакции алкоголиза, ацидолиза, этерификации и переэтерификации в условиях низкого содержания воды [1]. В качестве активных компонентов липазы входят в состав лекарственных ферментных препаратов, назначаемых при внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы [2]. Благодаря высокой стабильности в органических растворителях, широкой субстрат-

ной специфичности и энантиоселективности липазы успешно применяют в фармацевтической промышленности для получения лекарственных средств: антибактериальных и противоопухолевых антибиотиков, препаратов, содержащих алкалоиды, нестероидных противовоспалительных препаратов [3, 4]. Также липазы используют для получения продуктов немедицинского назначения — ряда биополимеров и биодизельного топлива [5, 6]. Ферментативный катализ обеспечивает снижение стоимости процессов за счёт сокращения количества технологических стадий, мягких условий реакций и высокой чистоты получаемых продуктов. Использование липазы В из *Candida antarctica* позволило осуществить одностадийный синтез водорастворимой формы антибиотика клиндамицина — пальмитата гидрохло-

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 119021, г. Москва, ул. Б. Пироговская, 11, стр. 1. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе.
E-mail: almyashevanelya@mail.ru

рида и повысить выход продукта на 40% по сравнению со стандартным трёх стадийным химическим способом [7].

Актуальность поиска новых липолитических ферментов и их продуцентов обусловлена тем, что липазы специфичны у разных видов организмов. Например, было показано, что панкреатическая липаза осуществляет асимметрическую альдольную реакцию между 4-нитробензальдегидом и ацетоном с выходом целевого продукта более 96%, в то время как выход продукта при использовании липаз из *Mucor miehei*, *C. antarctica* и *Pseudomonas cepacea* не превышает 10% [8].

Ксилотрофные базидиальные грибы способны продуцировать широкий спектр окислительных и гидролитических ферментов, позволяющих им утилизировать все компоненты растительной биомассы. Наличие липаз отмечено как у ксилотрофных базидиомицетов (*Pleurotus sapidus*, *Schizophyllum commune*), так и у гумусовых сапротрофов (*Agaricus bisporus*), однако их активность и условия продуцирования изучены недостаточно [9–11]. В настоящей работе проведен скрининг продуцентов липолитических ферментов среди ксилотрофных базидиомицетов, а также выявлены особенности продуцирования липаз наиболее перспективными штаммами на плотных средах и в погруженной культуре.

Материал и методы

Реактивы. Трибутирин и глицерин были приобретены у «Sigma-Aldrich» (США), фосфорная кислота, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия были приобретены у «Carl Roth» (Германия), гуммиарабик, олеиновая кислота, сульфат аммония и сульфат магния были приобретены у ООО «Русхим» (Россия), агар-агар, глюкоза, ферментативный пептон и дрожжевой экстракт были приобретены у ООО «НТК ДИА-ЭМ». В работе использовали полуобезжиренную соевую муку, молочную сыворотку, пивное сусло (4° по Баллингу) и подсолнечное масло пищевого качества.

Штаммы. Штаммы *Flammulinave lutipes* 42, *Flammulinave lutipes* F-526, *Ganoderma lucidum* 5.1, *Lentinu sedodes* cs-53, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* 1 были получены из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА». Штаммы *Armillariamelea* 0738, *Flammulinave lutipes* 1483, *Flammulina rossica* 1981, *Ganoderma lucidum* 1319, *Grifola frondosa* 2639, *Grifola frondosa* 0917, *Hericium erinaceus* 0912, *Hericium coralloides* 045, *Hericium coralloides* 1891, *Hypsizigu sulmarius* 1018, *Hypsizigu sulmarius* 1320, *Laetiporus sulphureus* 1429, *Laetiporus sulphureus* 1336, *Phallusim pudicus* 0613 были получены из коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В. П. Комарова РАН. Штаммы *Aspergillus niger* 823, *Aspergillus terreus* 826, *Aspergillus foetidus* 734 и *Yarrowia lipolytica* 8218 были получены из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур («Leibniz-Institut DSMZ», Германия). Рабочие культуры хранили на скошенном картофельно-глюкозном агаре при 4°C.

Скрининг продуцентов липаз. На этапе скрининга для оценки липолитической активности исследуемые штаммы выращивали на среде, содержащей (г/л водопроводной воды): агар-агар — 15,0; трибутирин — 10,0; пептон — 5,0 и дрожжевой экстракт — 3,0. Трибутирин предварительно эмульгировали в воде ультразвуком в течение 1 мин (выходная мощность 85 Вт; ультразвуковой излучатель S-450D, «Branson», США).

Чашки Петри засеивали агаровыми блоками с 10-дневными культурами грибов (диаметр 1 мм) и инкубировали при 25°C в течение 96 ч, после чего проводили измерение диаметров колоний (d) и зон просветления вокруг них (D). Липолитическую активность грибов оценивали по величине «гало» (D-d) по шкале с шагом 5 мм, маркированной от «—» (нет активности) до «++++» (наибольшая активность).

Подбор компонентов плотной питательной среды. Базидиомицеты выращивали при 25°C на 35 плотных средах, которые представляли собой парные сочетания различных источников углерода и азота. В качестве источников углерода использовали глюкозу, пивное неохмеленное сусло, крахмал, этанол, глицерин, подсолнечное масло, олеиновую кислоту в концентрациях, эквивалентных 20 г/л глюкозы, в качестве источников азота — дрожжевой экстракт, пептон, соевую муку, кукурузный экстракт и нитрат аммония в концентрациях, эквивалентных 10 г/л пептона. Исследовали штаммы, отобранные на этапе скрининга. После завершения роста колоний вырезали агарово-мицелиальные блоки (7 мм × 4 мм) и помещали их в центр чашек Петри со средой, содержащей (г/л фосфатного буферного раствора, pH 6,5): агар-агар — 15,0; трибутирин — 10,0. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Трибутирин предварительно эмульгировали в воде ультразвуком в течение 1 мин. Липолитическую активность оценивали по величине зоны просветления по шкале с шагом 5 мм, маркированной от «—» (нет активности) до «++++» (наибольшая активность).

Условия погруженного культивирования. Погруженное культивирование отобранных штаммов проводили в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл, содержащих 100 мл среды, при 220 об/мин и температуре 28°C. Объём посевного материала составлял 10% объёма ферментационной среды. В качестве посевного материала использовали 9-суточную культуру *Hericium erinaceus* 0912 и 5-суточную культуру *T. versicolor* 1, выращенную в описанных выше условиях на среде, содержащей (г/л водопроводной воды): глюкозу — 20,0; соевую муку — 10,0; дигидрофосфат калия — 2,5 и сульфат магния — 0,25 [12].

Биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через лавсановую ткань, фильтрат использовали для дальнейших исследований. Биомассу высушивали при 50°C в течение суток.

Определение липазной активности. Липолитическую активность фильтрата культуральной жидкости определяли газохроматографическим методом с использованием эмульсии трибутирина в качестве субстрата. Субстрат готовили добавлением трибутирина (10% вес.) в водный раствор гуммиарабика (1% вес.) и обработкой смеси ультразвуком в течение 2 мин. К 400 мкл раствора субстрата добавляли 400 мкл фильтрата культуральной жидкости и инкубировали смесь при 37°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Реакцию ферментативного гидролиза прерывали добавлением 30 мкл фосфорной кислоты (85%). Реакционную смесь центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g, концентрацию масляной кислоты в водной фазе определяли на газовом хроматографе Кристалл-5000.2 («Хроматек», Россия) с колонкой Хромосорб 102 (3 м × 3 мм, «Sigma-Aldrich», США). За единицу липолитической активности (U) принимали количество масляной кислоты (моль), образующееся при каталитическом воздействии липаз, приходящихся на 1 мл фильтрата культуральной жидкости или 1 мг белка. Содержание белка определяли методом Лоури с использованием липазы *Rhizopusoryzae* («Sigma-Aldrich», США) в качестве стандарта.

Выделение и очистка липаз. Все этапы выделения и очистки липаз проводили при 4°C. Фильтрат культуральной жидкости центрифугировали 20 мин при 10000 g для отделения остатков биомассы и нерастворимых компонентов питательной среды. К супернатанту при постоянном перемешивании добавляли сульфат аммония до 80% насыщения и оставляли на 4 ч. Суспензию центрифугировали 20 мин при 10000 g, осадок растворяли в минимальном количестве фосфатного буфера (pH

Таблица 1. Скрининг продуцентов липолитических ферментов диффузионным методом

№	Штамм	Диаметр колонии (d), мм	Липолитическая активность
Базидиомицеты			
1	<i>Armillaria melea</i> 0738	3,8	—
2	<i>Flammulina velutipes</i> 42	4,5	—
3	<i>F.velutipes</i> F-526	6,3	+
4	<i>F.velutipes</i> 1483	3,0	—
5	<i>Flammulina rossica</i> 1981	5,0	—
6	<i>Ganoderma lucidum</i> 5	18,3	—
7	<i>G.lucidum</i> 1319	2,5	+
8	<i>Grifola frondosa</i> 2639	3,5	—
9	<i>G.frondosa</i> 0917	4,5	+
10	<i>Hericum erinaceus</i> 0912	3,3	++++
11	<i>Hericum coralloides</i> 045	1,8	+
12	<i>H.coralloides</i> 1891	1,8	+
13	<i>Hypsizigus ulmarius</i> 1018	5,5	—
14	<i>H.ulmarius</i> 1320	3,0	—
15	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1429	9,0	+
16	<i>L.sulphureus</i> 1336	6,3	—
17	<i>Lentinus edodes</i> cs-53	3,0	—
18	<i>Phallus impudicus</i> 0613	2,8	—
19	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,5	++
20	<i>Trametes versicolor</i> 1	4,0	++++
Несовершенные грибы и аскомицеты			
21	<i>Aspergillus niger</i> 823	4,0	++
22	<i>Aspergillus terreus</i> 826	6,0	—
23	<i>Aspergillus foetidus</i> 734	3,0	++
24	<i>Yarrowia lipolytica</i> 8218	15,0	+++

6,5). Раствор белков диализировали против фосфатного буферного раствора с добавлением ЭДТА (0,1 М) в течение 16 ч. Выделение липаз проводили методом гель-фильтрации с использованием сорбента Sephadex G75 («Pharmacia», Швеция) на колонке (100 мм × 10 мм), уравновешенной фосфатным буфером (рН 6,5). Элюирование производили тем же буферным раствором, отбирали 25 фракций по 1 мл, после чего определяли липолитическую активность каждой фракции.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования была оценена способность 20 штаммов базидиальных грибов продуцировать липолитические ферменты. Базидиомицеты выращивали на плотной питательной среде, содержащей трибутирин в качестве единственного источника углерода, после чего измеряли величину зон гидролиза вокруг колоний. В качестве положительного контроля были использованы штаммы известных продуцентов липаз — несовершенных грибов рода *Aspergillus* и дрожжеподобного аскомицета *Yarrowia lipolytica* [13—15].

В условиях эксперимента липолитическая активность отсутствовала у 55% исследованных штаммов базидиомицетов, слабую активность («+» и «+++») проявили 35% штаммов. Выраженная липолитическая активность, превышающая показатели положительных контролей, была отмечена у двух штаммов — *H.erinaceus* 0912 и *T.versicolor* 1. Данные штаммы были отобраны для дальнейших экспериментов (табл. 1).

В эксперименте ряд видов базидиомицетов был представлен набором штаммов. Анализ их активности показал, что способность к образованию липолитических ферментов носит преимущественно штаммоспецифический, а не видоспе-

цифический характер. Исключение составили только штаммы *H.coralloides* и *H.ulmarius*. Это заключение подтверждают имеющиеся в научной литературе работы, в которых штаммы видов *T.versicolor* и/или *H.erinaceus* показали либо невысокую липолитическую активность, либо её отсутствие. Так, исследованиями гидролитических ферментов штаммов грибов из коллекции культур базидиомицетов была отмечена низкая липолитическая активность штаммов *T.versicolor* 353 и *H.erinaceus* 970 и более высокая — у штаммов *Ganoderma lucidum* 1900, *G.frondosa* 976, *L.sulphureus* 352, *P.ostreatus* 551 и *L.edodes* 502 [16]. Изучение культур базидиомицетов, выделенных из плодовых тел, произраставших на территории Южной Индии, показало, что штамм *T.versicolor* не обладает липолитической активностью в отличие от *G.lucidum* [17].

На следующем этапе исследования было изучено образование липолитических ферментов двумя отобранными штаммами на плотных и жидких питательных средах. Для установления влияния источников питания на продукцию липолитических ферментов штаммы *H.erinaceus* 0912 и *T.versicolor* 1 выращивали на 35 плотных средах, различающихся сочетаниями источников углерода и азота. *H.erinaceus* 0912 культивировали в течение 168 ч, *T.versicolor* 1 — в течение 96 ч. После завершения роста колоний вырезали одинаковые агарово-мицелиальные блоки и помещали в центр чашек Петри с тест-средой, содержащей трибутирин. Данный опыт позволил оценить липолитическую активность метаболитов грибов, содержащихся в исследуемых агаровых

Таблица 2. Влияние источников углерода и азота в питательной среде на липолитическую активность *H.erinaceus* 0912

	Дрожжевой экстракт	Пептон	Соевая мука	Кукурузный экстракт	Нитрат аммония
Глюкоза	+	—	+	+	P/o
Пивное неохмеленное сусло	+++	—	+	+	P/o
Крахмал	+	—	+++	+	P/o
Этанол	+	—	++	+	P/o
Глицерин	+	—	++	++	P/o
Подсолнечное масло	+++	+	++	++	P/o
Олеиновая кислота	+++	+	++++	+++	P/o

Примечание. P/o — рост отсутствует.

Таблица 3. Влияние источников углерода и азота в питательной среде на липолитическую активность *T.versicolor* 1

	Дрожжевой экстракт	Пептон	Соевая мука	Кукурузный экстракт	Нитрат аммония
Глюкоза	—	—	—	—	—
Пивное неохмеленное сусло	+	—	—	—	—
Крахмал	+	—	+	—	—
Этанол	+	—	—	—	—
Глицерин	+	—	—	—	—
Подсолнечное масло	+	+	+	+	—
Олеиновая кислота	++	—	—	+	+

блоках. Полученные результаты показали, что в условиях эксперимента штамм *H.erinaceus* 0912 проявил более высокую липолитическую активность по сравнению с *T.versicolor* 1 (табл. 2, 3). Состав питательной среды ожидаемо оказал принципиальное значение на образовании липолитических ферментов базидиомицетами. Существенная липолитическая активность *T.versicolor* 1 была отмечена только на одной среде, содержащей олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт. Лучшей для образования липолитических ферментов штаммом *H.erinaceus* 0912 оказалась среда с олеиновой кислотой и соевой мукой. Также высокая активность этого штамма была отмечена на средах, содержащих пивное сусло и дрожжевой экстракт, подсолнечное масло и дрожжевой экстракт, олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт, крахмал и соевую муку, олеиновую кислоту и кукурузный экстракт. Таким образом, полученные результаты показали, что проявлению высокой липолитической активности способствуют установленные сочетания источников углерода и азота, внесение же в питательную среду источника углерода липидной природы без учёта используемого источника азота не гарантирует успеха при получении липаз. Однако при подборе компонентов питательной среды авторы большинства работ не учитывают влияние источников азота на липолитическую активность грибов, что затрудняет анализ представленных в литературе данных. Так, наличие липидных компонентов в среде способствовало продукции липаз такими видами базидиомицетов, как *Tyromyces sambuceus* и *Pleurotussapidus* [18, 19]. Однако известна работа со штаммом *Antrodia cinnamomea* BCRC 35396, у которого выход липаз на средах с глицерином и сахарозой более чем в 3 раза пре-

вышал выход липаз на средах, содержащих жирные кислоты [20].

Погруженное культивирование базидиомицетов проводили на средах, содержащих те же источники углерода и азота, что и отобранные плотные питательные среды, а именно олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт для *T.versicolor* 1 и олеиновую кислоту и соевую муку для *H.erinaceus* 0912. Штамм *T.versicolor* 1 накапливал наибольшее количество липаз в культуральной жидкости уже через 36 ч (75,42 мУ/мл культуральной жидкости), в то время как максимальный выход биомассы (0,83 г/100 мл) был получен через 60 ч (см. рис. 1). Полученные результаты превышают показатели несовершенных грибов, например, оптимальным для получения липаз временем культивирования *Aspergillus oryzae* являлось 72 ч, *Penicillium melinii* UzLM-4 — 96 ч [21, 22]. Время культивирования является основным критерием, определяющим эффективность биотехнологического процесса. Таким образом, возможность получения целевого продукта за более короткий срок по сравнению с известными продуцентами делает *T.versicolor* 1 перспективным штаммом для промышленного получения липаз. Использование отобранных базидиальных грибов в биотехнологических процессах получения ферментных препаратов также предпочтительнее за счёт отсутствия токсичных метаболитов в культуральной жидкости, отсутствии споровой нагрузки на персонал и экологической чистоты отходов. Сравнение продуктивности штамма *T.versicolor* 1 с продуктивностью используемых в промышленности липолитически активных штаммов можно будет проводить после оптимизации процесса образования липаз этим штаммом.

Погруженное культивирование *H.erinaceus* 0912 на отобранной среде показало, что штамм

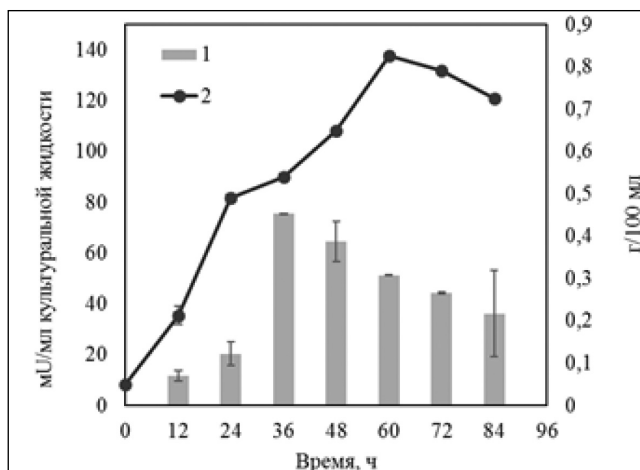


Рис. 1. Кривая роста *T.versicolor* 1 и динамика накопления внеклеточных липаз при погруженном культивировании.
1 — липолитическая активность; 2 — выход биомассы.

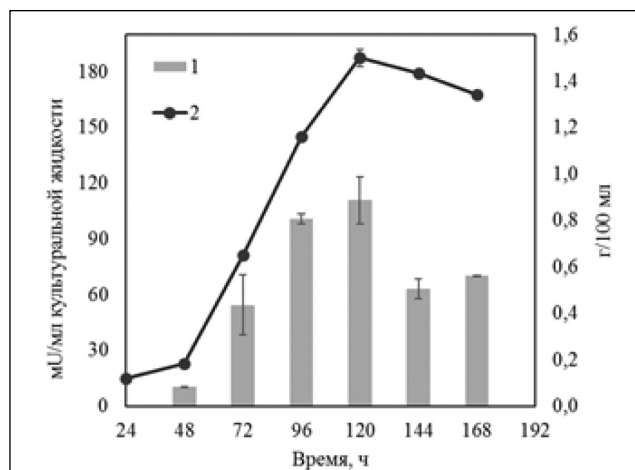


Рис. 2. Кривая роста *H.erinaceus* 0912 и динамика накопления внеклеточных липаз при погруженном культивировании.
1 — липолитическая активность; 2 — выход биомассы.

Таблица 4. Липолитическая активность *H.erinaceus* 0912 в результате погруженного культивирования в течение 96 ч

№	Исходная среда	Дополнительные источники питания	Липолитическая активность, мУ/мл культуральной жидкости	Выход воздушно-сухой биомассы, г/100 мл
1	Олеиновая кислота,	—	22,36±9,10	0,42±0,16
2	соевая мука	Пивное неохмеленное сусло	75,89±0,43	1,20±0,09
3		Дрожжевой экстракт	46,81±0,78	0,92±0,19
4		Кукурузный экстракт	100,82±2,79	1,12±0,04

Таблица 5. Активность выделенных препаратов липолитических ферментов базидиомицетов

Этапы выделения и очистки	<i>T.versicolor</i> 1		<i>H.erinaceus</i> 0912	
	активность, мУ/мг белка	выход белка, %	активность, мУ/мг белка	выход белка, %
Фильтрат культуральной жидкости	1,66±0,01	100,00	4,05±0,04	100,00
Осаждение сульфатом аммония и диализ	155,53±0,01	3,33	61,04±0,03	3,53
Гель-фильтрация	792,64±52,70	0,08	204,55±3,51	0,44

является медленно растущим. Липолитическая активность на 96 ч процесса культивирования была невысока — 22 мУ/мл культуральной жидкости. Вероятно, это было связано со слабым ростом базидиомицета на данной жидкой питательной среде, выход воздушно-сухой биомассы составил 0,42 г/100 мл. Добавление в питательную среду дополнительных источников питания позволило увеличить липолитическую активность и выход биомассы базидиомицета, однако не было отмечено прямой зависимости между изменениями этих показателей. Максимальное значение активности было получено при использовании кукурузного экстракта в качестве дополнительного источника азота и составило 100,82 мУ/мл культуральной жидкости (табл. 4).

На жидкой питательной среде, содержащей олеиновую кислоту, соевую муку и кукурузный экстракт, липолитическая активность *H.erinaceus* 0912 увеличивалась с ростом биомассы и достигала максимального значения (110,87 мУ/мл куль-

туральной жидкости) через 120 ч погруженного культивирования (рис. 2).

Масса препарата липолитических ферментов, выделенных из культуральной жидкости *H.erinaceus* 0912, в 5,5 раз превышала, массу препарата из культуральной жидкости *T.versicolor* 1 (табл. 5). Сравнительное изучение действия липаз двух штаммов показало, что активность ферментов *T.versicolor* 1 (792,6 мУ/мг белка) более чем в три раза превышает активность ферментов *H.erinaceus* 0912 (204,55 мУ/мг белка). Различие в активности ферментных препаратов данных штаммов указывает на то, что *H.erinaceus* 0912 и *T.versicolor* 1 скорее всего продуцируют разные типы липолитических ферментов.

Выводы

1. Исследование липолитической активности 20 штаммов базидиальных грибов позволило выявить два перспективных штамма-продуцента липаз — *T.versicolor* 1 и *H.erinaceus* 0912 и предположить, что способность продуцировать липоли-

тические ферменты носит штаммоспецифичный характер.

2. Исследованы особенности продуцирования липолитических ферментов штаммами *T.versicolor* 1 и *H.erinaceus* 0912 на плотных средах и в погруженной культуре. Наибольшая активность штамма *T.versicolor* 1 была отмечена через 36 ч погруженного культивирования на среде, содержащей олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт, штамма *H.erinaceus* 0912 — через 120 ч на среде с

олеиновой кислотой, соевой мукой и кукурузным экстрактом.

3. Исследована активность липолитических ферментов базидиальных грибов, выделенных из культуральной жидкости. Активность липаз *T.versicolor* 1 составила 792,6 мУ/мг белка, *H.erinaceus* 0912 — 204,55 мУ/мг белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 16-38-00904 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gandhi N.N. Applicationsoflipase. Journalofthe American Oil Chemists' Society 1997; 74: 6: 621—634.
2. Шифрин О. С. Ферментные препараты в лечении внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы. Гастроэнтерология. Приложение к журналу Consilium Medicum 2007; 1: 14—16. / Shifrin O. S. Fermentnye preparaty v lechenii vneshnesekretornoj nedostatochnosti podzheludochnoj zhelezy. Gastroenterologiya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum 2007; 1: 14—16. [in Russian]
3. Безбородов А. М., Загустина Н. А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор). Прикладная биохимия и микробиология 2014; 50: 4: 347—347. / Bezborodov A. M., Zagustina N. A. Lipazy v reakcijakh kataliza v organicheskom sinteze (obzor). Prikladnaja biokhimija i mikrobiologija 2014; 50: 4: 347—347. [in Russian]
4. Pandey A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology and applied biochemistry 1999; 29: 2: 119—131.
5. Uyama H., Wada S., Fukui T., Kobayashi S. Lipase-catalyzed synthesis of polyesters from anhydride derivatives involving dehydration. Biochemical engineering journal 2003; 16: 2: 145—152.
6. Samoylova Y. V. et al. Application of the immobilized bacterial recombinant lipase from *Geobacillus stearothermophilus*. Catalysis in Industry 2016; 8: 2: 187—193.
7. Li Z. et al. Lipase-catalyzed one-step and regioselective synthesis of clindamycin palmitate. Organic Process Research & Development 2013; 17: 9: 1179—1182.
8. Li C. et al. Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. Green Chemistry 2008; 10: 6: 616—618.
9. Fermor T. R., Grant W. D. Degradation of fungal and actinomycete mycelia by *Agaricus bisporus*. Microbiology 1985; 131: 7: 1729—1734.
10. Singh M.K., Singh J., Kumar M., Thakur I.S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2014; 110: 92—99.
11. Zorn H., Breithaupt D. E., Takenberg M., Schwack W., Berger R. G. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. Enzyme and microbial technology 2003; 32: 5: 623—628.
12. Соболева П. Ю., Краснопольская Л. М., Федорова Г. Б., Камруха Г. С. Антибиотические свойства штаммов базидиального гриба *Lentinusedodes* (Berk.) Sing. Антибиотики и химиотер 2006; 51: 7: 3—8. / Soboleva P. Ju., Krasnopol'skaja L. M., Fedorova G. B., Katrukha G. S. Antibioticheskie svoystva shtamov bazidial'nogo griba *Lentinusedodes* (Berk.) Sing. Antibiotiki i khimioter 2006; 51: 7: 3—8. [in Russian]
13. Al'myasheva N.R., Kopitsyn D.S., Vinokurov V.A., Novikov A.A. Methanolysis of Sunflower Oil Using Immobilized Fungal Cells as Biocatalyst. Chemistry and Technology of Fuels and Oils 2015; 50: 6: 449—452.
14. Fabiszewska A.U., Stolarzewicz I.A., Zamojska W.M., Bialecka-Florjańczyk E. Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. Applied Biochemistry Microbiol 2014; 50: 4: 404—410.
15. Nair C.S., Bone D.H. Production of lipase of *Aspergillus foetidus* in a batch stirred reactor. Biotechnology Letters 1987; 9: 8: 601—604.
16. Krupodorova T., Ivanova T., Barshteyn V. Screening of extracellular enzymatic activity of macrofungi. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2014; 3: 4: 315.
17. Goud M.J.P., Suryam A., Lakshminipathi V., Singara Charya M. A. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. African Journal of Biotechnology 2009; 8: 3: 354—360.
18. Hädrich-Meyer S., Berger R.G. Localization of lipolytic and esterolytic activities of *Tyromyces sambucus*, a 4-decanolide-producing basidiomycete. Applied Microbiology and Biotechnology 1994; 41: 2: 210—214.
19. Linke D., Zorn H., Gerken B., Parlar H., Berger R.G. Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). Lipids 2005; 40: 3: 323—327.
20. Lin E.S., Wang C.C., Sung S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. Enzyme and Microbial Technology 2006; 39: 1: 98—102.
21. Makhsumkhanov A.A., Yakubov I.T., Davranov K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UzLM-4 and its biosynthesis of lipases. Applied Biochemistry and Microbiology 2003; 39: 1: 40—43.
22. Ohnishi K., Yoshida Y., Sekiguchi J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. J Fermentation and Bioengineering 1994; 77: 5: 490—495.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Альмяшева Н. Р. — инженер, ФГБНУ «НИИНА», лаборатория биосинтеза биологически активных соединений; аспирант РГУ нефти и газа (НИУ) им. И. М. Губкина, кафедры физической и коллоидной химии, Москва

Гольшикин А. В. — инженер, ФГБНУ «НИИНА», лаборатория биосинтеза биологически активных соединений, Москва

Зиангирова М. Ю. — научный сотрудник, ФГБНУ «НИИНА», лаборатория биосинтеза биологически активных соединений, Москва

Петрова Д. А. — инженер, РГУ нефти и газа (НИУ) им. И. М. Губкина, кафедра физической и коллоидной химии; аспирант МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

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

Оценка воздействия бактериофагов на микробные клетки методом электрооптического анализа

*О. И. ГУЛИЙ^{1,2}, О. А. КАРАВАЕВА¹, О. С. ЛАРИОНОВА²,
С. В. ЛАРИОНОВ², Л. Г. ЛОВЦОВА², К. Ю. УСКОВ², В. Д. БУНИН³

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

² Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

³ EloSystems GbR, Берлин

Electro-optical Analysis of the Effects of Bacteriophages on Microbial Cells

* O. I. GULIY^{1,2}, O. A. KARAVAEVA¹, O. S. LARIONOVA², S. V. LARIONOV², L. G. LOVTSOVA², K. YU. USKOV², V. D. BUNIN³

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov

² Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov

³ EloSystems GbR, Berlin

Исследовано влияние бактериофага ΦAb-Sp7 на изменение электрооптических (ЭО) параметров суспензий клеток в отношении 14 штаммов бактерий рода *Azospirillum*, 2 штаммов рода *Niveispirillum*, 2 штаммов *Escherichia coli* и 2 штаммов *Pseudomonas putida*, а также клеток *Acinetobacter* и *Nitrospirillum*. Показано, что ЭО анализатор позволяет разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бактериальных клеток со специфичным бактериофагом от контрольных экспериментов, когда такое взаимодействие отсутствует. Регистрация инфекции микробной клетки бактериофагом методом ЭО анализа служит информативным параметром наличия или отсутствия чувствительности клетки к изучаемому бактериофагу. Полученные результаты позволяют определить критерий специфического взаимодействия, который заключается в изменении величины оптического сигнала не менее ~10%, при добавлении в суспензию микробных клеток определённого количества бактериофагов. Результаты представляют интерес с практической точки зрения, поскольку могут быть использованы для создания метода экспресс-оценки воздействия бактериофагов на микробные клетки.

Ключевые слова: бактериофаги, метод электрооптического анализа клеточных суспензий.

The effect of the ΦAb-Sp7 bacteriophage on the change in the electro-optical (EO) parameters of cell suspensions with respect to 14 strains of bacteria of the genus *Azospirillum*, 2 strains of the genus *Niveispirillum*, 2 strains of *Escherichia coli*, and 2 strains of *Pseudomonas putida*, as well as *Acinetobacter* and *Nitrospirillum* cells was studied. It is shown that the EO analyzer makes it possible to differentiate situations when bacterial cells interact with a specific bacteriophage from control experiments with no such interaction. The registration of a microbial cell infection with a bacteriophage by the EO analysis method serves as an informative parameter of the presence or absence of cell sensitivity to the bacteriophage studied. The obtained results make it possible to determine the criterion for a specific interaction, which consists of a change in the magnitude of the optical signal by not less than ~10% when a certain amount of bacteriophages is added to the suspension of microbial cells. The results are of interest from a practical point of view since they can be used to create a method for rapid assessment of the effects of bacteriophages on microbial cells.

Keywords: bacteriophages, electro-optical analysis of cell suspensions.

Введение

Предположение, что бактериофаги, вызывающие лизис патогенных для человека и животных бактерий, могут быть использованы в качестве терапевтического средства было высказано ещё в 1917 г. Д'Эррелем. Эта гипотеза послужила толчком к развитию фаготерапии [1, 2]. В 1921 г. бактериофаги впервые были применены в терапевтических целях. Р. Брийонг и Д. Майсин в своих отчётах сообщали об успешном применении стафи-

лококкового фага в лечении инфекционных заболеваний кожи. С тех пор препараты бактериофагов активно использовались для лечения заболеваний бактериальной этиологии. Однако с открытием антибиотиков и налаживанием их производства в промышленных масштабах разработка фаговых препаратов отодвинулась на второй план [3]. В бывшем СССР развитие фаготерапии связано с именем Г. Г. Элиава. По его инициативе был создан Институт Бактериофагов (г. Тбилиси, Грузия), где разрабатывались лечебно-профилактические препараты на основе бактериофагов, которые успешно применялись в борьбе с рядом инфекционных заболеваний. Бактериофаги являют-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

ся эффективным средством борьбы с рядом возбудителей (в том числе с теми, которые устойчивы к действию антибиотиков) [4–7]. Эффективность бактериофагов обусловлена их специфичным действием, а также простотой подготовки препаратов и низкой стоимостью по сравнению с разработкой новых антибиотиков против устойчивых штаммов бактерий.

На сегодняшний день из-за увеличения количества штаммов микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, вновь проявляется интерес к фототерапии. При этом понимание особенностей взаимодействия бактериофагов с микробными клетками и определение литической активности бактериофагов является необходимым условием для их успешного применения. Для определения спектра литического действия бактериофагов традиционно используется ряд стандартных микробиологических методов, таких как высеивание на агаризованную среду методом двуслойного агара [8–10], метод «фаговой дорожки» [11–12] и метод реплик [8, 13–14].

Кроме того, для определения литической активности бактериофагов используют современные методы, такие как:

- метод электроориентационной спектроскопии, основанный на регистрации изменения оптических свойств микробной суспензии под влиянием переменного электрического поля [15];

- метод флуоресцентной спектроскопии, основанный на внесении в систему мембранотропного зонда и регистрации интенсивности флуоресценции [16];

- методы с использованием биосенсоров на основе бактериофагов, регистрирующих взаимодействие инфекционных агентов с клетками-мишенями [17–18].

В связи с высокой востребованностью исследования взаимодействия бактериофагов с микробными клетками для определения спектра литической активности бактериофагов, развитие новых и совершенствование используемых методов имеет значительный потенциал. Регистрация инфекции микробной клетки бактериофагом является информативным параметром наличия/или отсутствия чувствительности клетки к изучаемому бактериофагу.

Методы электрооптического (ЭО) анализа все чаще находят применение для решения проблем, возникающих как в биотехнологии, так и в прикладной микробиологии. Цикл ранних исследований по изучению электрофизических свойств микроорганизмов, выполненный с привлечением бактериальных клеток различной таксономической принадлежности и различных действующих агентов (ксенобиотики, антитела, бактериофаги, антибиотики), убедительно продемонстрировал одну общую закономерность. При отсут-

ствии специфичного взаимодействия действующего агента с бактериальными клетками ЭО параметры клеточной суспензии после его добавления остаются неизменными. И наоборот, специфичное взаимодействие вещества с клетками приводит к выраженному изменению величины ЭО сигнала [19–21].

Цель работы — регистрация взаимодействия микробных клеток с бактериофагами методом ЭО анализа для определения спектра литического действия бактериофагов.

Материал и методы

Штаммы бактерий и условия их культивирования. В работе использовали микробные клетки *Azospirillum brasilense* штаммов Br 14, Cd, Jm6B2, KR77, S17, S27, Sp7 (IBPPM 150), Sp107, Sp245, SR55, SR75 (IBPPM 22), *A. halopraeferans* Au4, *A. lipoferum* штаммов SR65 (IBPPM 44), Sp59b (IBPPM 173) и RG20a, *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, *Nitrospirillum amazonense* Am14, *Escherichia coli* штаммов B-878, XL-1, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, а также *Pseudomonas putida* штаммов BA-11, C-11 и *Acinetobacter calcoaceticum* A-122, полученные из коллекции лаборатории Саратовского НИИ «Биокатализа» (г. Саратов).

Штаммы *E. coli*, *P. putida* и *A. calcoaceticum* хранили при 4°C на питательной среде LB, содержащей: агар-агар — 30 г/л, дрожжевой экстракт (DIFCO, США) — 5 г/л; пептон (Becton, Dickinson and Company, Франция) — 10 г/л; NaCl (Becton, Dickinson and Company, Франция) — 5 г/л. Данные штаммы обновляли каждую неделю [22]. Микробные клетки пересеивали один раз в две недели и хранили при 4°C.

Для экспериментов бульонные культуры всех штаммов микроорганизмов получали с использованием жидкой питательной среды LB следующего состава: NaCl — 5 г/л; дрожжевой экстракт — 5 г/л; пептон — 10 г/л. По 50 мл питательной среды разливали в колбы объемом 250 мл и производили стерилизацию в автоклаве в течение 30 мин при давлении 1 атм. Затем при помощи бактериологической петли производили посев культур с чашки Петри на жидкую стерильную LB. Культивирование проводили на шейкере при температуре 30±1°C в течение 18 ч и интенсивности перемешивания 160 об/мин.

Для определения титра бактериофагов методом двухслойного агара по Грациа использовали полужидкую среду LB, содержащую 7 г/л агар-агара и твердую, содержащую 15 г/л или 30 г/л агар-агара [8].

Выделение бактериофагов азоспирилл. Для выхода бактериофагов из клеток азоспирилл на клетки воздействовали индуктирующим фактором (низкой температурой), как описано в работе С. С. Макарихиной с соавт. [23].

Определение количества вирусных частиц. Для определения количества частиц вирусов использовали спектрофотометрический метод. Измерения проводили на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 (Analytik Jena, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН). Исходя из соотношения, что 2×10^{14} фаговых частиц/мл соответствуют 30 опт. ед. [24], для расчетов использовали следующую формулу: $(A_{269} - A_{320}) \times 10^{14} / 15$, где A_{320} — оптическая плотность суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 320 нм, A_{269} — оптическая плотность суспензии при длине волны 269 нм.

Для подсчета титра бактериофага также использовали метод двухслойного агара, предложенный Грациа [8]. Среду LB,

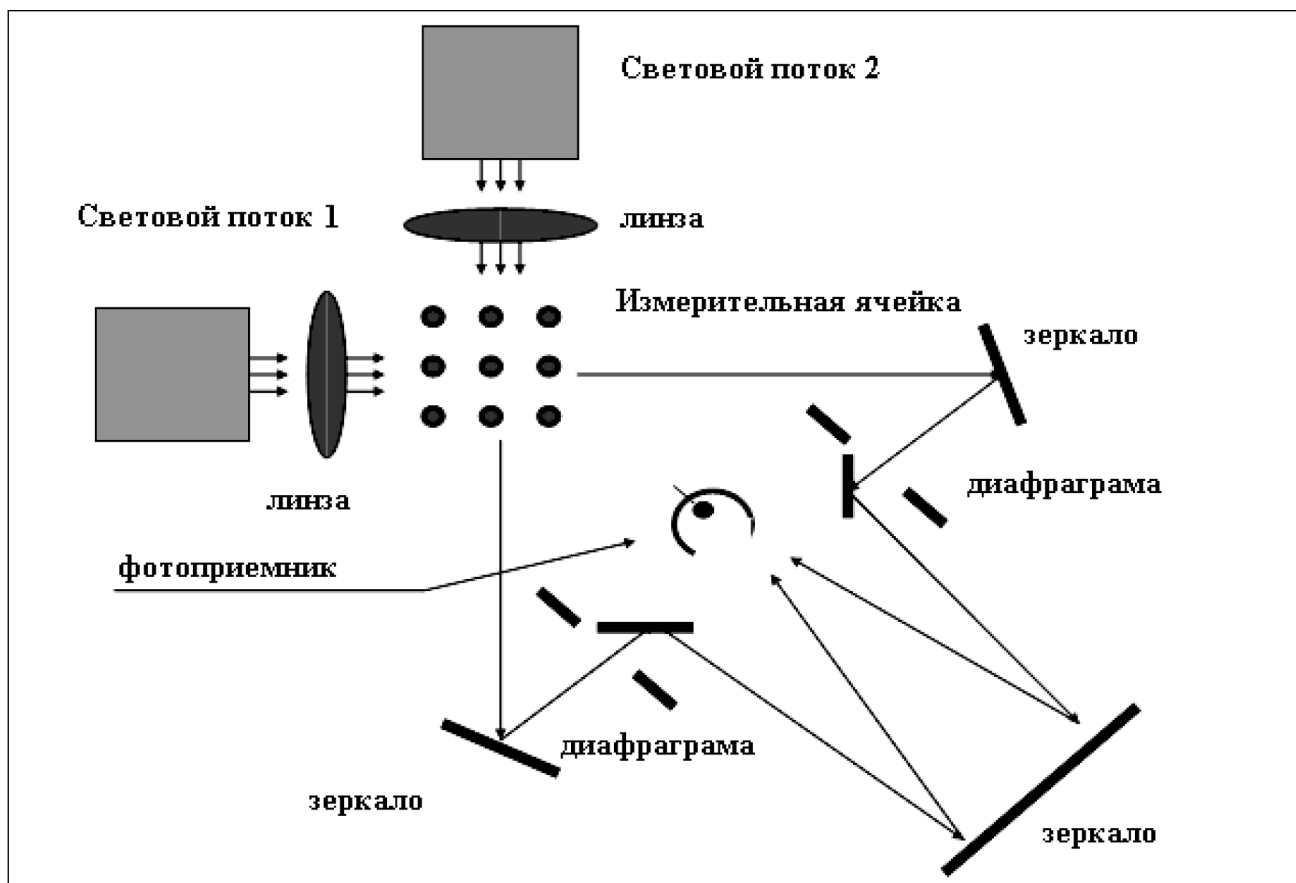


Рис. 1. Схема оптической части электрооптического анализатора ELOAnalyzer.

содержащую 1,5% агара, разливали по чашкам Петри, давали полностью застыть, а затем подсушивали приоткрытые чашки Петри в течение 20 мин под ультрафиолетовой лампой. Пробирки с 2,5 мл стерильной 0,7% агаризованной средой нагревали до температуры 90°C, а затем охлаждали до 45–48°C. Затем добавляли в них 500 мкл фаговой суспензии и 200 мкл 18-часовой бульонной культуры. После тщательного и быстрого перемешивания смесь выливали на поверхность питательной LB-среды с 1,5% агаром и равномерно распределяли её по всей поверхности чашки. Инкубацию проводили в течение 18–20 ч при температуре 32°C. Далее выполняли подсчёт негативных колоний, умножая при этом получившееся число на степень разведения суспензии фага. Таким образом, получали титр бактериофага, выраженный в количестве фаговых частиц в 1 мл жидкости [8].

Определение спектра литической активности бактериофагов. Выращенные в жидких питательных средах бактериальные культуры наносили на поверхность 1,5% агаризованной LB-среды. Стерильным шпателем распределяли по всей поверхности питательной среды бактериальную взвесь и подсушивали чашки Петри в термостате 15–20 мин. На наклонную поверхность засеянной таким образом питательной среды наносили каплю бактериофага так, чтобы она стекла на противоположную сторону чашки Петри. Инкубировали засеянные чашки Петри при 32°C в течение 18–20 ч. В качестве контроля использовали чашки Петри с культурами без нанесения бактериофага.

Результат считали положительным в случае образования прозрачной зоны лизиса на бактериальном газоне в том месте, куда наносили суспензию бактериофага [8, 25].

Проведение ЭО анализа клеточных суспензий. Перед проведением электрооптического анализа осуществляли трехкратную отмывку центрифугированием клеток всех используемых штаммов от культуральной среды в течение 5 мин при 2800 g. Для отмывки микробных клеток использовали дистиллированную воду с электропроводностью 1,6 мС/см. Электропроводность определяли с помощью кондуктометра HANNA HI 8733 (Румыния). Полученную суспензию вновь центрифугировали в течение 1 мин при 110 g для устранения конгломератов. Оптическую плотность полученного супернатанта доводили дистиллированной водой до значения $OD_{670}=0,42–0,45$, что соответствовало $4,5 \times 10^8$ клеток/мл. Ориентационные спектры клеток измеряли на электрооптическом анализаторе ELOAnalyser (EloSystem GbR, Германия). Параметры измерения: напряженность электрического поля 93,1 В/см, длина волны света 670 нм (относительно вакуума), время приложения электрического поля 3,0 сек. На рис. 1 приведено схематическое изображение оптической части анализатора.

Объём измерительной ячейки составлял 1 мл, концентрация клеток (в единицах оптической плотности) — $OD_{670}=0,42–0,45$. Количество клеток определяли стандартным методом подсчёта с использованием прямой световой микроскопии. В экспериментах оперировали дискретным набором частот ориентирующего электрического поля: 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц.

Логарифмическая зависимость разности значений оптической плотности суспензий OD, измеренной при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля, от частоты представлялась в виде ориентационных спектров. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток [26, 27].

Для каждой серии экспериментов проводили не менее пяти измерений. Анализ и представление данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel 2010 и стандартных методов статистической обработки.

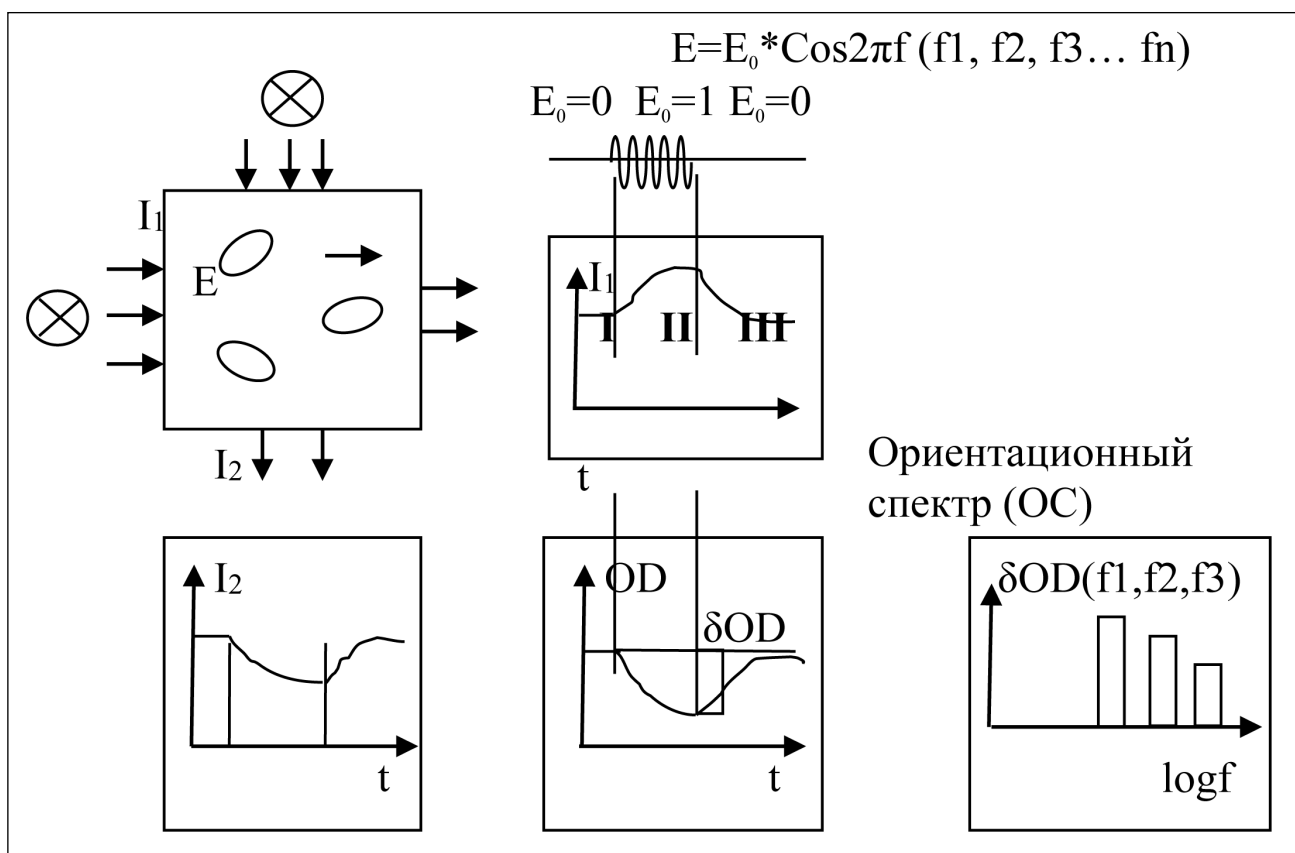


Рис. 2. Схема изменения оптической плотности микробной суспензии в процессе ЭО эксперимента.

Примечание. I — момент приложения электрического поля (хаотическая ориентация клеток); II — момент выключения поля (клетки в ориентированном состоянии); III — момент возвращения клеток в состояние с хаотической ориентацией.

Результаты и обсуждение

Известно, что некоторые виды бактериофагов обладают широким спектром литической активности и инфицируют лишь определённые штаммы одного вида бактерий, тогда как другие характеризуются множественной вирулентностью [28]. Основная идея экспериментов заключалась в демонстрации возможности использования метода ЭО анализа для регистрации инфекции микробных клеток бактериофагами и определения спектра литической активности бактериофагов.

Принцип метода ЭО анализа микробных суспензий заключается в том, что изменения оптических свойств микробной суспензии регистрируются под влиянием переменного электрического поля. Измерение зарядов, индуцированных электрическим полем, происходит на границе клеточных структур. После взаимодействия зарядов на этой границе с электрическим полем меняется ориентация бактерий в окружающей среде, что приводит к изменению оптических свойств суспензии [29]. Схема изменения оптической плотности микробной суспензии в процессе ЭО эксперимента представлена на рис. 2.

Необходимо отметить, что все разрабатываемые методы регистрации взаимодействия микроб-

ных клеток с бактериофагами универсальны и могут быть использованы для определения активности вирусов, относящихся к различным группам.

В качестве исследуемого бактериофага в работе использовали бактериофаг ФAb-Sp7, который ранее был выделен авторами из микробных клеток *A. brasiliense* Sp7, основные свойства бактериофага описаны в работе [30].

Оценку воздействия бактериофага ФAb-Sp7 с помощью метода ЭО анализа определяли в отношении микробных клеток, полученных из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: *Azospirillum brasilense* штаммов Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75; *A. lipoferum* штаммов Sp59b, SR65 и RG20a; *A. halopraefers* Au4; *Nitrospirillum amazonense* Am14; *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, а также бактерий: *Escherichia coli* штаммов XL-1 и B-878; *Pseudomonas putida* штаммов C-11 и BA-11; *Acinetobacter calcoaceticum* A-122.

Выбор клеток *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3 и *Nitrospirillum amazonense* Am14 обусловлен их близкородственностью с клетками азоспирилл. До недавнего момента они относились к роду *Azospirillum*, но были переклассифицированы [31]. Выбор клеток *Escherichia*,

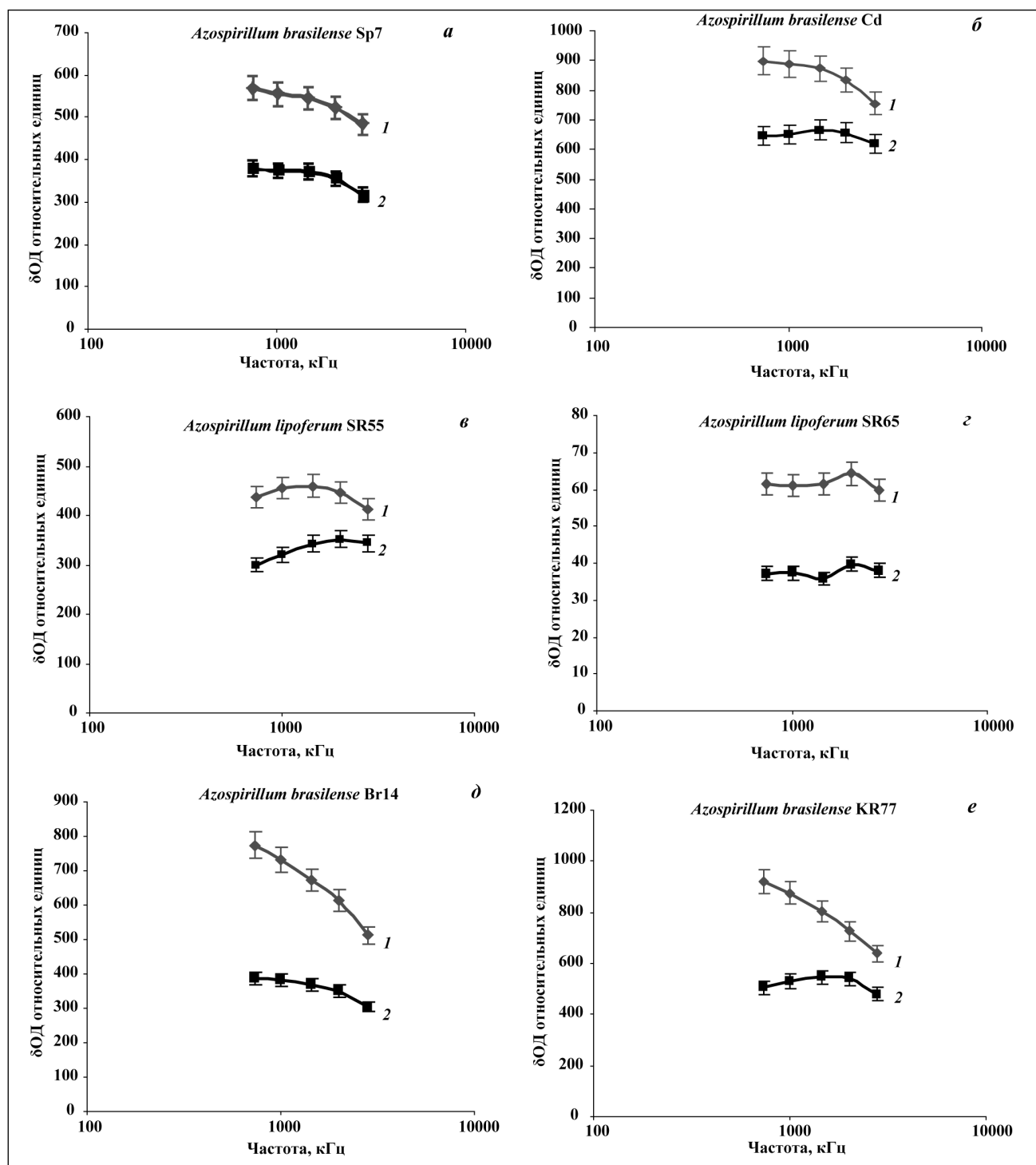


Рис. 3. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток.

а – *A. brasilense* Sp7; б – *A. brasilense* Cd; в – *A. brasilense* SR55; г – *A. lipoferum* SR65; д – *A. brasilense* Br14; е – *A. brasilense* KR77 при их инфекции бактериофагом ФAb-Sp7: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофага.

Pseudomonas и *Acinetobacter* обусловлен иным таксономическим положением.

Согласно предварительным экспериментам по оптимизации условий проведения анализа (выбор частоты измерения, времени взаимодействия, количества микробных клеток в измерительной ячейке) были выбраны следующие условия

измерений: напряженность электрического поля 17 В/см при времени приложения электрического поля 16 сек и проведение измерений на частотах 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц. Поскольку ранее нами было установлено, что значительные изменения ЭО параметров суспензии клеток происходят при внесении в неё бактериофагов из расчёта

20 фагов на бактерию, в данной серии экспериментов применялись те же условия.

С помощью ЭО датчика исследовали суспензии клеток при их инфекции бактериофагом ФАб-Sp7. Для этого в измерительную ячейку вносили микробные клетки и регистрировали аналитический сигнал. Затем в суспензию вносили исследуемый бакте-

риофаг и регистрировали соответствующие изменения ЭО сигнала. Показано, что при инфекции микробных клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 (рис. 3, а), Cd (рис. 3, б), SR55 (рис. 3, в), Br14 (рис. 3, д), KR77 (рис. 3, е), Sp107 (рис. 4, а) и S27 (рис. 4, б) и *A. lipoferrum* SR65 (рис. 3, з) бактериофагом ФАб-Sp7 происходит изменение величины ЭО сигнала.

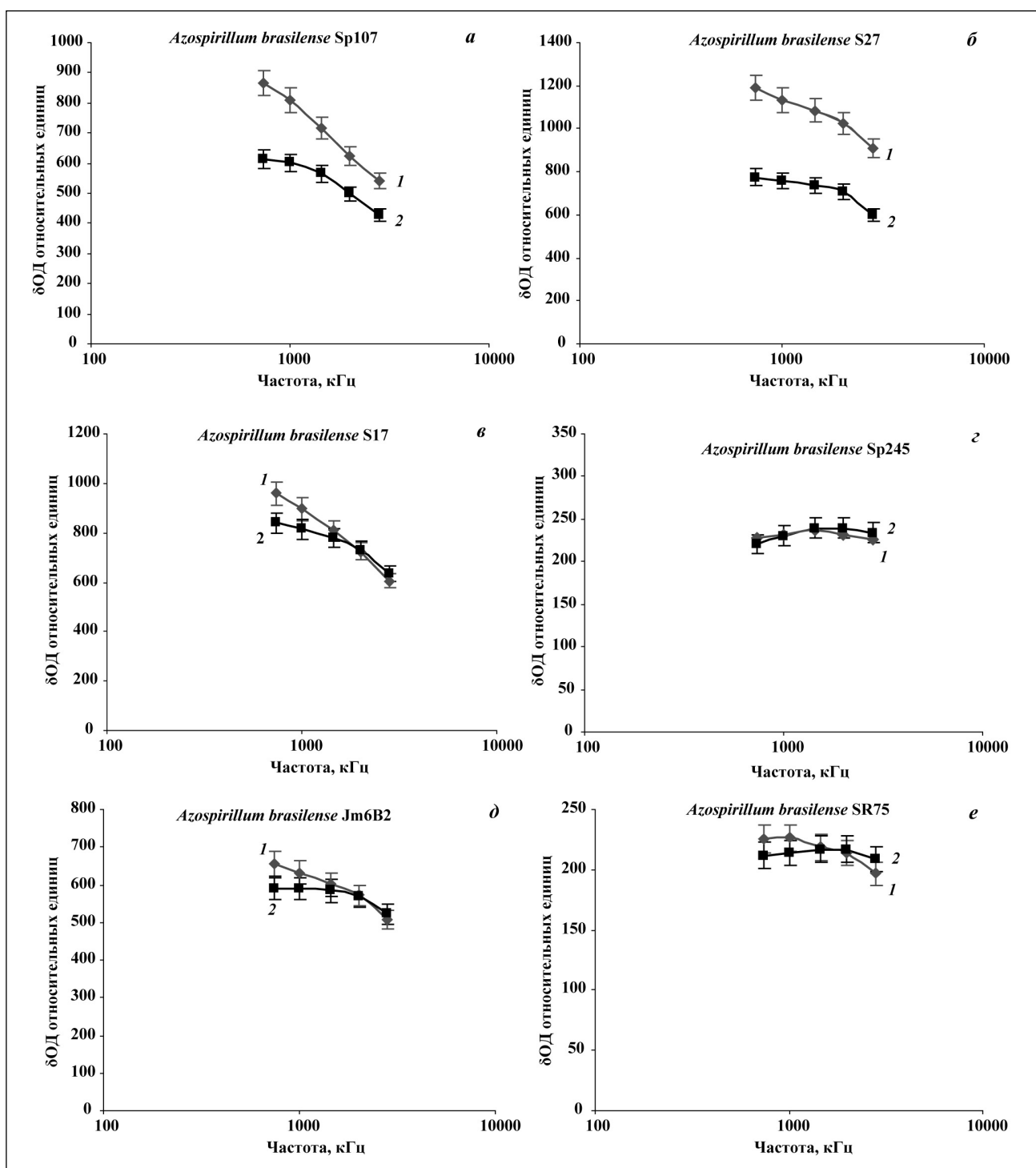


Рис. 4. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток.

а – *A. brasilense* Sp107; б – *A. brasilense* S27; в – *A. brasilense* S17; г – *A. brasilense* Sp245; д – *A. brasilense* Jm6B2; е – *A. brasilense* SR75 при их инфекции бактериофагом ФАб-Sp7: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофагов.

При изучении воздействия бактериофага ФАb-Sp7 на бактерии *A. brasilense* штаммов S17 (рис. 4, в), Sp245 (рис. 4, г), Jm6B2 (рис. 4, д), SR75 (рис. 4, е) показано, что величина ЭО сигнала суспензии клеток значительно не изменяется.

На следующем этапе проверялась активность бактериофага ФАb-Sp7 в отношении представи-

телей других видов азоспирилл, при этом в качестве объектов использовались клетки *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, *A. lipoferum* штаммов Sp59b и RG20a.

Специфичные изменения ЭО параметров клеточных суспензий под действием бактериофага

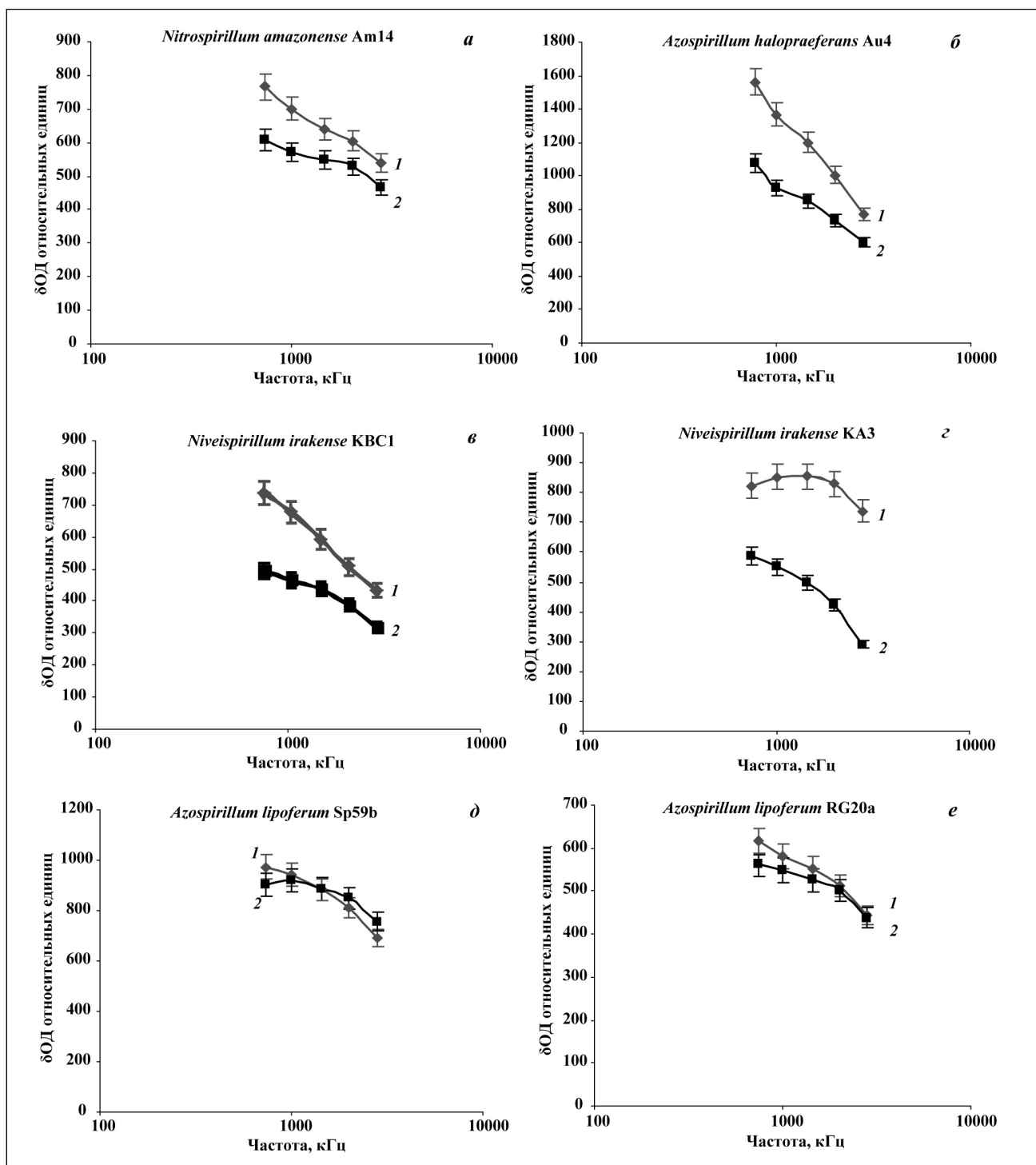


Рис. 5. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток.

а – *Nitrospirillum amazonense* Am14; б – *A. halopraeferans* Au4; в – *Niveispirillum irakense* KBC1; г – *N. irakense* KA3; д – *A. lipoferum* Sp59b; е – *A. lipoferum* RG20a при взаимодействии с бактериофагом ФАb-Sp7: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофагов

ΦAb-Sp7 происходят у микробных клеток *Nitrospirillum amazonense* Am14 (рис. 5, а), *A.halopraeferans* штамма Au4 (рис. 5, б), *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 (рис. 5, в) и КА3 (рис. 5, г).

Показано, что у суспензий клеток *A.lipoferum* штаммов Sp59b (рис. 5, д) и RG20a (рис. 5, е) изменений ЭО параметров при их воздействии исследуемого бактериофага не происходит.

Проведённые исследования продемонстрировали отсутствие активности бактериофага ΦAb-Sp7 по отношению к бактериям гетерологичных родов: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*.

На следующем этапе работы представляло интерес сравнить результаты, полученные с помощью метода ЭО анализа микробных суспензий с данными, полученными при помощи стандартного микробиологического метода определения спектра литической активности бактериофагов методом «стекающая капля» (таблица). Как видно из представленных данных результаты, полученные двумя независимыми методами, совпадают.

Поскольку данные ЭО анализа микробных суспензий подтверждены стандартным микробиологическим методом определения селективности действия бактериофага, можно утверждать, что микробные клетки *A.brasilense* Sp7, Cd, Br14, SR55, Sp107, S27, *Nitrospirillum amazonense* Am14, *A.halopraeferans* Au4, *A.lipoferum* SR65, *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и КА3 являются чувствительными к изучаемому бактериофагу. Бактерии *A.brasilense* штаммов Sp245, Jm6B2, SR75, S17, *A.lipoferum* штаммов Sp59b и RG20a, *Escherichia coli* штаммов XL-1 и B-878, *Pseudomonas putida* C-11 и BA-11, *Acinetobacter calcoaceticum* A-122, устойчивы к фагу ΦAb-Sp7.

Полученные данные согласуются с результатами группы Е. Л. Жиленкова [16]. Авторами при помощи электро-ориентационной спектроскопии показано, что при взаимодействии микобактериофага МТРН11 с клеткой-хозяином происходит уменьшение величины ЭО эффекта, что связано с изменением электрофизических свойств суспензии клеток. Было установлено, что регистрируемые датчиком изменения ЭО параметров, значительно отличаются у суспензий клеток устойчивых и чувствительных штаммов.

Таким образом, в результате исследований на примере бактериофага ΦAb-Sp7 показана возможность использования метода ЭО анализа для оценки воздействия бактериофагов на микробные клетки. Показано, что специфические изменения ЭО параметров клеточных суспензий под действием бактериофага происходят только у микробных клеток, чувствительных к изучаемому бактериофагу, т. е. ЭО анализатор позволяет разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бактериальных клеток со

Сравнение данных по определению литической активности бактериофага ΦAb-Sp7, полученных методами «стекающая капля» и электрооптического анализа микробных суспензий

Микроорганизмы	Определение литической активности бактериофага ΦAb-Sp7	
	метод «стекающая капля»	метод ЭО анализа микробных суспензий
<i>A.brasilense</i> Sp7	+	+
<i>A.brasilense</i> Cd	+	+
<i>A.brasilense</i> Sp107	+	+
<i>A.brasilense</i> Sp245	—	—
<i>A.brasilense</i> Jm6B2	—	—
<i>A.brasilense</i> Br14	+	+
<i>A.brasilense</i> KR77	+	+
<i>A.brasilense</i> S17	—	—
<i>A.brasilense</i> S27	+	+
<i>A.brasilense</i> SR55	+	+
<i>A.brasilense</i> SR75	—	—
<i>A.halopraeferans</i> Au4	+	+
<i>A.lipoferum</i> Sp59b	—	—
<i>A.lipoferum</i> RG20a	—	—
<i>A.lipoferum</i> SR65	+	+
<i>Nitrospirillum amazonense</i> Am14	+	+
<i>Niveispirillum irakense</i> KBC1	+	+
<i>Niveispirillum irakense</i> КА3	+	+
<i>P.putida</i> C-11	—	—
<i>P.putida</i> BA-11	—	—
<i>E.coli</i> XL-1	—	—
<i>E.coli</i> B-878	—	—
<i>Acinetobacter calcoaceticum</i>	—	—

Примечание. «+» — наличие лизиса бактериальной культуры для метода «стекающая капля» / наличие разницы в сигнале между контролем и экспериментом для метода ЭО анализа; «—» — отсутствие лизиса бактериальной культуры для метода «стекающая капля» / отсутствие разницы в сигнале между контролем и экспериментом для метода ЭО анализа.

специфичным бактериофагом от контрольных экспериментов, когда такое взаимодействие отсутствует. Зафиксированные изменения ЭО параметров клеток, чувствительных к действию бактериофага, вероятно, связаны с различными повреждениями внутриклеточных структур, обусловленными адсорбцией бактериофага на поверхности микробной клетки, выходом вирусной ДНК в цитоплазму клеток-хозяина и процессами, происходящими в цитоплазме [32]. Регистрация инфекции микробной клетки бактериофагом с помощью метода ЭО анализа может служить информативным параметром наличия или отсутствия чувствительности клетки к изучаемому бактериофагу. Полученные данные позволяют определить критерий специфического взаимодействия, который заключается в изменении величины оптического сигнала не менее ~10%, при добавлении в суспензию клеток определённого количества бактериофагов. С

практической точки зрения, результаты могут быть использованы для создания метода экс-

пресс-оценки воздействия бактериофагов на микробные клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фильчиков М.В., Осмаков Д.И., Логовская Л.В., Сыквилда Н.Н., Кадыхов В.А., Курочкина Л.П., Месянжинов В.В., Бернал Р.А., Мирошников К.А. Пространственная реконструкция капсида и идентификация поверхностных белков бактериофага SN *Pseudomonas aeruginosa* электронно-микроскопическими методами. Биоорганическая химия 2009; 35: 6: 808—815. / Fil'chikov M.V., Osmakov D.I., Logovskaja L.V., Sykvilinda N.N., Kadykov V.A., Kurochkina L.P., Mesjanzhinov V.V., Bernal R.A., Miroshnikov K.A. Prostranstvennaja rekonstrukcija kapsida i identifikacija poverkhnostnykh belkov bakteriofaga SN *Pseudomonas aeruginosa* jelektronno-mikroskopicheskimi metodami. Bioorganicheskaja khimija 2009; 35: 6: 808—815. [In Russian]
2. Abedon S.T., Thomas-Abedon C., Thomas A., Mazure H. Bacteriophage prehistory. Bacteriophage 2011; 1: 3: 174—178.
3. Phage therapy: bacteriophages as antibiotics. Elizabeth Kutter, Evergreen State College, Olympia, WA 98505. Nov. 15, 1997.
4. Летапов А.В., Голомидова А.К., Тарасян К.К. Экологические основы рациональной фаговой терапии. Acta naturae 2010; 2: 1: 66—79. / Letarov A.V., Golomidova A.K., Tarasjan K.K. Jekologicheskie osnovy racional'noj fagovoj terapii. Acta naturae 2010; 2: 1: 66—79. [In Russian]
5. Пименов Н.В., Субботин В.В., Данилевская Н.В. Лечение и профилактика сальмонеллеза голубей и животных зоопарков с использованием фаготерапии и пробиотика. Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные 2013; 6: 6—8. / Pimenov N.V., Subbotin V.V., Danilevskaja N.V. Lechenie i profilaktika sal'monelleza golubej i zhivotnykh zooparkov s ispol'zovaniem fagoterapii i probiotika. Rossijskij veterinarnyj zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye 2013; 6: 6—8. [In Russian]
6. Jones J.B., Jackson L.E., Balogh B., Obradovic A., Iriarte F.B., Momol M.T. Bacteriophages for plant disease control. Annual Review of Phytopathology 2007; 45: 245—262.
7. Wittebole X., De Roock S., Opal S.M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence 2014; 5: 1: 209—218.
8. Бактериофаги / М.Адамс М.: Медгиз, 1961; 521. / Bakteriofagi / M. Adams M.: Medgiz, 1961; 521. [In Russian]
9. Григорьева Т.М., Кузин А.И., Азизбекян Р.Р. Умеренные фаги *Brevibacillus laterosporus*. Биотехнология 2007; 4: 18—24. / Grigor'eva T.M., Kuzin A.I., Azizbekjan R.R. Umerennye fagi *Brevibacillus laterosporus*. Biotekhnologija 2007; 4: 18—24. [In Russian]
10. Мурадов М., Черкасов Г.В., Ахмедова Д.У., Халмуратов А.Г. Новый умеренный цианофаг NP-1T, лизогенизирующий культуры циано-бактерий рода *Nostoc* и *Plectonema*. Микробиология. 1990; 59: 6: 1038—1045. / Muradov M., Cherkasov G.V., Akhmedova D.U., Khalmuradov A.G. Novyj umerennyj cianofag NP-1T, lizogenirujushhij kul'tury cianobakterij roda *Nostoc* i *Plectonema*. Mikrobiologija. 1990; 59: 6: 1038—1045. [In Russian]
11. Практическое пособие по бактериофагии / И.М.Габрилович. Мн.: Высшая школа. 1968; 178. / Prakticheskoe posobie po bakteriofagii / I.M.Gabrilovich. Mn.: Vysshaja shkola. 1968; 178. [In Russian]
12. Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Васильева Ю.Б., Шестаков А.Г. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции. Вестник Уральской государственной сельскохозяйственной академии. Научно-теоретический журнал. 2011; 1 (13): 59—62. / Vasil'ev D.A., Semanina E.N., Zolotukhin S.N., Khajrullin I.N., Vasil'eva Ju.B., Shestakov A.G. Izuchenie osnovnykh biologicheskikh svojstv bakteriofagov *Bordetella bronchiseptica*, vydelennykh metodom indukcii. Vestnik Ural'skoj gosudarstvennoj sel'skokhozjajstvennoj akademii. Nauchno-teoreticheskij zhurnal. 2011; 1 (13): 59—62. [In Russian]
13. Манзенюк О.Ю., Воложанцев Н.В., Светоч Э.А. Идентификация бактерий *Pseudomonas mallei* с помощью бактериофагов *Pseudomonas pseudomallei*. Микробиология 1994; 63: 3: 537—544. / Manzenjuk O.Ju., Volozhancev N.V., Svetoch Je.A. Identifikacija bakterij *Pseudomonas mallei* s pomoshh'ju bakteriofagov *Pseudomonas pseudomallei*. Mikrobiologija 1994; 63: 3: 537—544. [In Russian]
14. Kumar J.S., Dhar B. Morphology and general characteristics of phages specific to *Lens culinaris* rhizobia. Biol. Fertil. Soils. 2010; 46: 681—687.
15. Гремякова Т.А., Жиленков Е.А., Новиков И.А., Оборотов М.В., Сазонов В.Э., Фомченков В.М. Изучение взаимодействия фагов и микроорганизмов с использованием методов флуориметрии и электроориентационной спектроскопии. Вестник Российской Академии наук 1999; 2: 24—25. / Gremjakova T.A., Zhilenkov E.A., Novikov I.A., Oborotov M.V., Sazonov V.E., Fomchenkov V.M. Izuchenie vzaimodejstvija fagov i mikroorganizmov s ispol'zovaniem metodov fljorimetrii i jelektroorientacionnoj spektroskopii. Vestnik Rossijskoj Akademii nauk 1999; 2: 24—25. [In Russian]
16. Жиленков Е.Л., Шемякин И.Г., Фомченков В.М., Иванов А.Ю., Гаврюшкин А.В., Оборотов М.В. Изучение взаимодействия микобактериофага МТРН11 с клеткой-хозяином на основе электронной микроскопии, флуориметрии и электро-ориентационной спектроскопии. Микробиология 1998; 67: 5: 666—671. / Zhilenkov E.L., Shemjakin I.G., Fomchenkov V.M., Ivanov A.Ju., Gavryushkin A.V., Oborotov M.V. Izuchenie vzaimodejstvija mikobakteriofaga MTRN11 s kletkoj-khozjainom na osnove jelektronnoj mikroskopii, fluorimetrii i jelektro-orientacionnoj spektroskopii. Mikrobiologija 1998; 67: 5: 666—671. [In Russian]
17. Balasubramanian S., Sorokulova I., Vodyanov V., Simonian A. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus* — a surface plasmon resonance spectroscopic study. Biosens Bioelectron 2007; 22: 6: 948—955.
18. Li S., Lib Y., Chenb H., Horikawaa S., Shena W., Simoniana A., Bryan A. China. Direct detection of *Salmonella typhimurium* on fresh produce using phage-based magneto elastic biosensors. Biosens Bioelectron 2010; 26: 4: 1313—1319.
19. Guliy O.I., Ignatov O.V., Shchyogolev S.Yu., Bunin V.D., Ignatov V.V. Quantitative determination of organophosphorus aromatic nitro insecticides by using electric-field cell orientation in microbial suspensions. Anal Chem Acta 2002; 462: 2: 165—177.
20. Гулий О.И., Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Дыкман Л.А., Игнатов В.В., Игнатов О.В. Электрооптические свойства микробных суспензий при взаимодействии клеток с антителами различной специфичности. Прикладная биохимия и микробиология 2010; 46: 1: 69—72. / Gulij O.I., Matora L.Ju., Burygin G.L., Dykman L.A., Ignatov V.V., Ignatov O.V. Jelektroopticheskie svojstva mikrobnykh suspenzij pri vzaimodejstvii kletok s antitelami razlichnoj specifichnosti. Prikladnaja biokhimiya i mikrobiologija 2010; 46: 1: 69—72. [In Russian]
21. Гулий О.И., Бунин В.Д., Игнатов О.В. Метод электрооптического анализа для регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки. Антибиотики и химиотерапия 2016; 61: 3—4: 3—13. / Gulij O. I., Bunin V. D., Ignatov O. V. Metod jelektroopticheskogo analiza dlja registracii vozdejstvija antibiotikov na mikrobnye kletki. Antibiotiki i khimioter 2016; 61: 3—4: 3—13. [In Russian]
22. Bertani G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lyso-genic *Escherichia coli*. J Bactertol 1951; 62: 293—300.
23. Макарихина С.С., Гулий О.И., Соколов О.И., Буров А.М., Павлий С.А., Сивко О.Н., Володин Д.Ю., Игнатов О.В. Выделение и характеристика бактериофага *Azospirillum lipoferum* штамма Sp 59b. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013; 13: 2: 56—61. / Makarikhina S.S., Gulij O.I., Sokolov O.I., Burov A.M., Pavlij S.A., Sivko O.N., Volodin D.Ju., Ignatov O.V. Vydelenie i kharakteristika bakteriofaga *Azospirillum lipoferum* shtamma Sp 59b. Izvestija Saratovskogo universiteta. Novaja serija. Serija Khimija. Biologija. Jekologija. 2013; 13: 2: 56—61. [In Russian]
24. Smith G.P., Scott J.K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods in enzymology 1993; 217: 228.
25. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дис. ... докт. биол. наук. Ульяновск, 2007; 322. / Zolotukhin S.N. Sozdanie i razrabotka skhem primeneniya diagnosticheskikh biopreparatov na osnove vydelennykh i izuchennykh bakteriofagov jenterobakterij: dis. ... dokt. biol. nauk. Ul'janovsk, 2007; 322. [In Russian]
26. Электрофизический анализ и разделение клеток / А.И.Мирошников, В.М.Фомченков, А.Ю.Иванов. М.: Наука, 1986; 185. / Jelektrofizicheskij analiz i razdelenie kletok / A.I.Miroshnikov, V.M.Fomchenkov, A.Ju.Ivanov. M.: Nauka, 1986; 185. [In Russian]
27. Bunin V.D., Voloshin A.G. Determination of cell structures, electrophysical parameters, and cell population heterogeneity. Journal Colloid Interface Science 1996; 180: 1: 122—126.
28. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С.Лабинская М.: Медицина, 1978; 394. / Mikrobiologija s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij / A.S.Labinskaja M.: Medicina, 1978; 394. [In Russian]
29. Shchyogolev S.Yu., Khlebtsov N.G., Bunin V.D., Sirota A.I., Bogatyryov V.A. Inverse problems in spectroturbidimetry of biological disperse systems with random and ordered particle orientation. Proc SPIE 1994; 2082: 167—176.
30. Гулий О.И., Караваяева О.А., Великов В.А., Соколов О.И., Павлий С.А., Ларионова О.С., Буров А.М., Игнатов О.В. Исследование адсорбции бактериофага ФАб-Sp7 на клеточной поверхности *Azospirillum brasilense* Sp7. Вопросы вирусологии 2016; 1: 45—48. / Gulij O.I., Karavaeva O.A., Velikov V.A., Sokolov O.I., Pavlij S.A., Larioanova O.S., Burov A.M., Ignatov O.V. Issledovanie adsorbicii bakteriofaga FAb-Sp7 na kletочноj poverkhnosti *Azospirillum brasilense* Sp7. Voprosy virusologii 2016; 1: 45—48. [In Russian]

31. Lin S.Y., Hameed A., Shen F.T., Liu Y.C., Hsu Y.H., Shahina M., Lai W.A., Young C.C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. Antonie van Leeuwenhoek 2014; 105: 6: 1149—1162.
32. Click E.M., Webster R.E. Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein. J Bacteriol 1997; 179: 20: 6464—6471.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гулий Ольга Ивановна — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Саратов

Караваева Ольга Александровна — к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов

Ларионова Ольга Сергеевна — д. б. н., заведующий кафедрой микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Ларионов Сергей Васильевич — д. вет. н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза», проректор по учебной работе ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Ловцова Лариса Геннадиевна — к. тех. н., доцент кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Усков Кирилл Юрьевич — магистрант 1 года обучения направления подготовки 19.04.01 Биотехнология кафедры микробиологии биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Бунин Виктор Дмитриевич — д. т. н., научный руководитель фирмы EloSystem GbR, Берлин, Германия

Количественные показатели экспрессии ERCC1 в ткани серозного рака яичников и эффективность I линии химиотерапии с включением препаратов платины

*Т. А. БОГУШ, М. Б. СТЕНИНА, Е. А. БОГУШ, В. Т. ЗАРКУА, С. А. КАЛЮЖНЫЙ, И. А. МАМИЧЕВ, А. С. ТЮЛЯНДИНА, С. А. ТЮЛЯНДИН

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина МЗ РФ, Москва

The Quantitative Indices of ERCC1 Expression in Serous Ovarian Cancer Tissue and the Efficacy of First-Line Platinum-Based Chemotherapy

*T. A. BOGUSH, M. B. STENINA, E. A. BOGUSH, V. T. ZARKUA, S. A. KALYUZHNYY, I. A. MAMICHEV, A. S. TYULYANDINA, S. A. TYULYANDIN, B. E. POLOTSKY, M. M. DAVYDOV

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

Платиносодержащие препараты — это группа широко используемых в клинике противоопухолевых лекарств. Их эффективность значительно различается у разных пациентов, что может быть связано с нарушением экспрессии белка эксцизионной репарации ERCC1. В настоящем проспективном исследовании методом проточной иммуноцитофлуориметрии проведён строго количественный анализ белка ERCC1 в хирургических биопсийных образцах серозного рака яичников. Экспрессия ERCC1 выявлена в 100% случаев, но по уровню экспрессии маркера (количество клеток, экспрессирующих ERCC1) опухоли различались значительно: минимальное значение составило 40%, максимальное — 77%, медиана — 64,5%; среднее — $64,3 \pm 9,0\%$. При анализе кривых Каплана-Майера отмечена обратная зависимость между экспрессией ERCC1 и продолжительностью безрецидивного периода в течение 40 мес наблюдения после завершения I линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов ($p < 0,0008$). В группе пациенток с низким уровнем экспрессии ERCC1 ($\leq 64,5\%$) медиана безрецидивного периода не достигнута, тогда как при высоком уровне ERCC1 ($> 64,5\%$) составила 9 мес. Различным было и количество рецидивов в группах с высоким и низким уровнем ERCC1 в опухоли — в 26 и 79% случаев, соответственно. Аналогичные закономерности выявлены и при оценке корреляции продолжительности безрецидивного течения болезни с показателем средней интенсивности экспрессии ERCC1 в клетках исследованных опухолей. Таким образом, количественное определение показателей экспрессии ERCC1 может прогнозировать эффективность первой линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины.

Ключевые слова: серозный рак яичников, ERCC1, платиносодержащая химиотерапия, проточная цитофлуориметрия.

Platinum-based drugs are widely used in clinical practice. Their efficacy varies widely among patients, which may be due to a disruption of the expression of ERCC1 — excision repair protein. In the prospective study a strictly quantitative analysis of the ERCC1 protein expression was carried out in surgical biopsy specimens of serous ovarian cancer by flow cytometry. ERCC1 expression was revealed in 100% of cases, but the expression level of the marker (the percentage of cells expressing ERCC1) varied significantly between tumors: the minimum was 40%, the maximum — 77%, the median — 64.5%; the average — $64.3 \pm 9.0\%$. The analysis of the Kaplan-Mayer curves showed an inverse relationship between the expression of ERCC1 and the duration of the relapse-free period during a 40-month follow-up after the first-line platinum-taxane chemotherapy ($p < 0.0008$). The median relapse-free period was not achieved in the group of patients with the low ERCC1 expression level ($\leq 64.5\%$), whereas it was 9 months in the group of high ERCC1 expression level ($> 64.5\%$). The number of relapses in the groups with high and low levels of ERCC1 was different, 26% and 79% cases, respectively. Similar correlations were revealed by comparison of the average intensity of ERCC1 expression with relapse-free survival. Thus, quantitative assessment of ERCC1 expression indices may predict the efficiency of first-line platinum-based chemotherapy of ovarian cancer.

Keywords: serous ovarian cancer, ERCC1, platinum-based chemotherapy, flow cytometry.

Введение

Платиносодержащие препараты — это группа широко используемых в клинике противоопухолевых лекарств. Однако их эффективность значительно различается у разных паци-

ентов даже при одних и тех же клинко-морфологических показателях заболевания. В основе подобной неопределённости лежат молекулярные особенности опухоли. В частности, важнейшим фактором, определяющим противоопухолевое действие препаратов платины, является активность репарации повреждений ДНК. Участие в этом процессе ERCC1 — белка эксцизионной репарации — доказано в много-

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции:

E-mail: tatbogush@mail.ru

численных фундаментальных исследованиях, на основании которых ERCC1 признан маркером резистентности к платиновым препаратам. Однако клинические наблюдения не столь однозначны. В ряде работ отмечена обратная корреляция между уровнем экспрессии ERCC1 и клинической эффективностью препаратов [1], в других — такая зависимость не выявляется [2] или отмечается прямая корреляция между показателями [3].

В полной мере это относится и к исследованиям экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников, в лечении которого платиносодержащие препараты занимают ведущую позицию, но прогнозирование эффективности химиотерапии остаётся до конца нерешённой задачей, поэтому до настоящего времени этот маркер рутинно в клинике не используется [4].

Причин такой ситуации видится несколько. Во-первых, методические неточности, в частности, разнообразие методов, несущих разную информацию (от полиморфизма генов до экспрессии белка), разнообразие объектов исследования (от крови до опухолевой ткани), субъективизм полуколичественной иммуногистохимической оценки результатов и исследование локальных участков опухоли, несмотря на её гетерогенность.

Во-вторых, неопределённость в оценке вклада ERCC1 в клиническую эффективность препаратов платины может быть связана с разнообразием критериев при проведении такой оценки. В частности, очевидна неправомерность использования показателя общей выживаемости для определения предиктивной значимости маркера в оценке эффективности препаратов платины, которые в большинстве случаев применяются только на начальных этапах лечения.

Учитывая несомненную важность молекулярного прогнозирования эффективности препаратов платины при лечении рака яичников, настоящая работа выполнена в условиях, максимально нивелирующих описанные недостатки. Иммунофлуоресцентным методом с привлечением проточной цитофлуориметрии проведена строго количественная интегральная оценка ERCC1 по большому образцу опухоли, что позволило минимизировать внутриопухолевую гетерогенность показателей экспрессии маркера. Клиническая значимость ERCC1 исследована на основании проспективной оценки корреляции показателей экспрессии ERCC1 с продолжительностью безрецидивного течения болезни после завершения I линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов в группах, соответствующих стандарту разделения опухолей на резистентные, условно чувствительные и чувствительные.

Материал и методы

Работа проведена на суспензиях опухолевых клеток серозного рака яичников, полученных из хирургических биопсийных образцов 38 пациенток, находящихся на лечении в «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Средний возраст пациенток составил 53 (34–66) лет. В 74% случаев диагностирована III стадия заболевания, в 13, 8 и 5% — I, II и IV стадии болезни, соответственно. В соответствии с результатами гистологического исследования высокодифференцированные опухоли диагностированы в 21% случаев, умеренно и низкодифференцированные опухоли встречались с одинаковой частотой — в 39% случаев.

Все пациентки в качестве I линии стандартной химиотерапии получали 6 курсов цисплатина или карбоплатина с паклитакселом. Для оценки корреляции экспрессии ERCC1 с эффективностью I линии терапии, образцы опухолей были разделены на три группы в соответствии с проспективными клиническими данными о продолжительности безрецидивного периода после окончания лечения: до 6 мес — резистентные опухоли ($n=6$); от 6 до 12 мес — условно чувствительные ($n=12$), более 12 мес ($n=22$) — чувствительные опухоли. Сравнение групп проведено по трём показателям, характеризующим экспрессию ERCC1.

1. Уровень экспрессии ERCC1 — количество специфически флуоресцирующих клеток в % по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами).
2. Интенсивность экспрессии маркера (усл. ед.) — отношение средней интенсивности специфической флуоресценции клеток к аналогичному показателю в контроле.
3. Интегральный индекс экспрессии ERCC1 — произведение уровня и интенсивности экспрессии маркера, деленное на 100.

Оценка количественных показателей экспрессии ERCC1 проведена иммунофлуоресцентным методом с привлечением проточной цитофлуориметрии, который адаптирован для исследования опухолевых маркеров в плотных тканях, лишён субъективизма и позволяет провести строго количественный анализ более 10 тыс клеток из образцов опухолей до 2 и более см в диаметре [5].

После получения одноклеточных суспензий клетки инкубировали в течение 30 мин с первичными моноклональными антителами, специфичными к ERCC1 (клон 8F1, ab2356, «Abcam», Великобритания) в конечном разведении 1:800. Далее в течение 30 мин проводили инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем DyLight650 (ab98729, «Abcam», Великобритания) в конечном разведении 1:1000. Выбор рабочей концентрации антител, соответствующей выходу специфического окрашивания клеток на плато, проведён в соответствии с калибровочной кривой зависимости специфической флуоресценции клеток от концентрации антител при заданных условиях инкубации.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios («Beckman Coulter», США). Для возбуждения флуоресценции использовали твёрдотельный диодный лазер с длиной волны испускаемого света 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции красителя DyLight650 проводили с помощью детектора FL-6. Использовали средний показатель скорости подсчёта анализируемых клеток; число анализируемых событий — 5000. Порог по параметру FS составлял 20 при напряжении 50В. Напряжение в каналах SS и FL-6 было установлено на 300 и 720В, соответственно. Количество специфически флуоресцирующих клеток рассчитывали с помощью теста Колмогорова-Смирнова, включённого в программу FlowJo 10.0.8 («FlowJo LLC», США).

Оценка корреляции количественных показателей экспрессии ERCC1 с эффективностью I линии терапии проведена при сравнении больных, в опухолях которых показатели экспрессии ERCC1 (уровень, интенсивность или интегральный индекс) были ниже или выше медианы значений по всем

исследованным образцам опухолей. Соответственно, опухоли составили две группы сравнения — с низкой и высокой экспрессией ERCC1.

По результатам анализа с помощью критерия Шапиро-Уилка распределение показателей экспрессии ERCC1 во всех сравниваемых группах оказалось нормальным, поэтому для оценки различий между группами применяли параметрический критерий *t* Стьюдента. Анализ проводили с использованием статистического пакета STATISTICA 7. Кривые продолжительности безрецидивного периода строили по методу Каплана-Мейера. Различия между группами рассчитывали с помощью логарифмического рангового критерия. Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Первый факт, который получен при анализе экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников — маркер выявлен во всех исследованных образцах опухолей. Это не кажется удивительным, так как

важнейшей функцией ERCC1 является поддержание стабильности клеточного генома и этот белок является облигатной составляющей любой живой клетки.

По уровню экспрессии маркера (количество клеток, экспрессирующих ERCC1) опухоли отличались значительно (рис. 1). В целом, уровень экспрессии был достаточно высоким: минимальное значение составило 40%, максимальное — 77%, то есть различия достигали 2 раз. Медиана уровня экспрессии ERCC1 составила 64,5%; среднее значение — $64,3 \pm 9,0\%$ клеток, экспрессирующих маркер в исследованных образцах опухолей.

По интенсивности экспрессии ERCC1 различия оказались более существенными, и показатель колебался от 2,4 до 14,5 усл. ед., то есть раз-

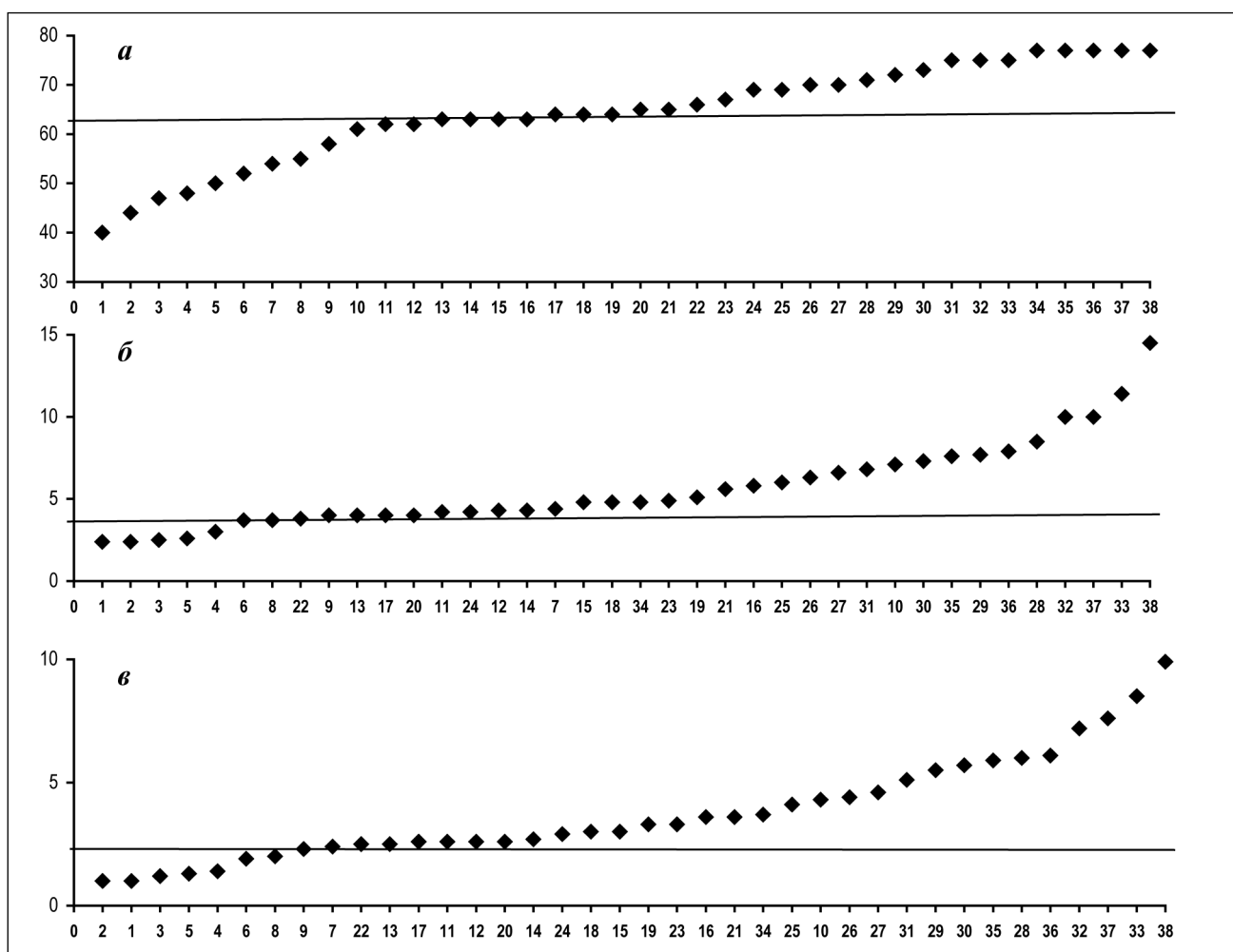


Рис. 1. Показатели экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников

По оси абсцисс — номера исследованных образцов опухолей; по оси ординат — показатель экспрессии ERCC1: уровень экспрессии — количество клеток (%), специфически окрашенных моноклональными антителами (а); интенсивность экспрессии — отношение средней интенсивности специфической флуоресценции клеток к аналогичному показателю в контроле (б); индекс экспрессии — произведение уровня и интенсивности экспрессии ERCC1, деленное на 100 (в). Значения показателей экспрессии ERCC1 на всех рис. ранжированы от меньшего к большему. Номера образцов опухолей на рис. 1, б и в соответствуют тем же опухолям на рис. 1, а. Горизонтальная линия на всех рис. указывает медиану каждого из показателей экспрессии ERCC1.

Показатели экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников в группах с разной чувствительностью к I линии химиотерапии препаратами платины и таксанами

Исследованные опухоли	Среднее значение показателя ± стандартное отклонение	Медиана показателя	Различия между группами, <i>p</i>
Уровень экспрессии ERCC1			
Резистентные	54,5±6,6	54,5	1 vs 2: 0,07
Условно-чувствительные	63,2±9,1	63,5	2 vs 3: 0,12
Чувствительные	67,5±9,4	68,5	1 vs 3: 0,004*
Интенсивность экспрессии ERCC1			
Резистентные	3,7±0,7	3,8	1 vs 2: 0,11
Условно-чувствительные	5,2±2,2	4,8	2 vs 3: 0,77
Чувствительные	6,4±3,1	5,7	1 vs 3: 0,09
Индекс экспрессии ERCC1			
Резистентные	2,0±0,6	2,2	1 vs 2: 0,03*
Условно-чувствительные	3,5±1,9	3,0	2 vs 3: 0,30
Чувствительные	4,5±2,6	3,7	1 vs 3: 0,003*

Примечание. * — различия между показателями в группах сравнения статистически значимы ($p < 0,05$).

личия между образцами опухолей были почти в 7 раз. Медиана интенсивности экспрессии ERCC1 составила 4,8; среднее значение — 5,7±2,8 усл. ед.

Сопоставление количественных значений уровня и интенсивности экспрессии маркера у одних и тех же пациенток выявило неполное соответствие показателей. Данные, представленные на рис. 2, демонстрируют дискордантность показателей в 26% исследованных опухолей: высокий уровень экспрессии ERCC1 при низкой интенсивности экспрессии маркера, и наоборот (на рис. 2 квадраты II и III). Совпадение молекулярного диагноза по двум показателям, то есть высокий уровень экспрессии ERCC1 с высокой интенсивностью или низкий уровень — с низкой

интенсивностью экспрессии маркера, отмечено в 76% случаев (на рис. 2 квадраты I и IV).

Учитывая это, проведено дополнительное разделение исследованных образцов опухолей на группы в соответствии с интегральным индексом, который включает в себя оба показателя — произведение уровня и интенсивности экспрессии ERCC1. Такой индекс наиболее часто используется при оценке опухолевых маркеров методом иммуногистохимии. Различия интегрального индекса среди исследованных опухолей были ещё значительнее — до 10 раз (от 1 до 9,9; рис. 1, в). Медиана показателя составила 3,2 усл. ед., среднее значение — 3,8±2,3.

Для оценки корреляции экспрессии ERCC1 с эффективностью I линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов, образцы опухолей были разделены на три группы в соответствии с клиническими данными о продолжительности безрецидивного периода после окончания лечения: до 6 мес — резистентные опухоли; 6–12 мес — условно чувствительные, более 12 мес — чувствительные. Анализ проведён по всем показателям, характеризующим экспрессию ERCC1, а именно, по уровню, интенсивности и интегральному индексу опухолевого маркера. Полученные результаты представлены в таблице.

Первое, что обращает на себя внимание, — по всем группам сравнения средние значения и медианы показателей экспрессии ERCC1 увеличиваются в ряду опухолей «резистентные → условно чувствительные → чувствительные». По показателю интенсивности экспрессии ERCC1 различия между группами не достигли статистической значимости, по уровню экспрессии — различия статистически достоверны между чувствительными и резистентными опухолями ($p=0,004$), а по значению интегрального индекса экспрессии ERCC1 статистически значимые различия выявлены не только между чувствительными и резистентными опухолями ($p=0,003$), но

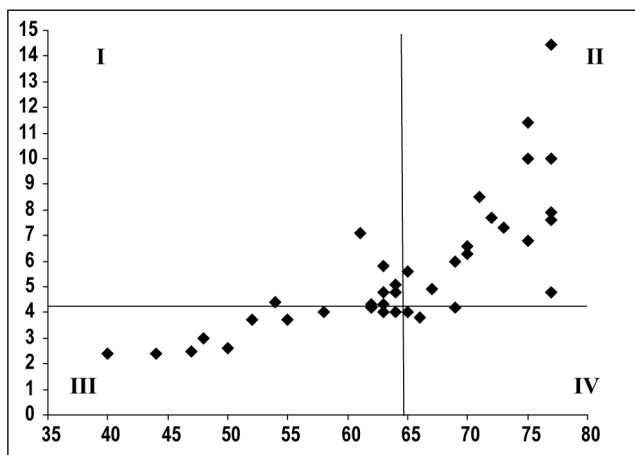


Рис. 2. Дискордантность показателей уровня и интенсивности экспрессии ERCC1 в одном и том же образце рака яичников.

По оси абсцисс — уровень экспрессии ERCC1: количество клеток (%), специфически окрашенных моноклональными антителами. По оси ординат — интенсивность экспрессии ERCC1: отношение средней интенсивности специфической флуоресценции клеток к аналогичному показателю в контроле. Вертикальная и горизонтальная линии на рисунке указывают медианы уровня и интенсивности экспрессии ERCC1.

и между резистентными и условно чувствительными ($p=0,03$). Последнее наблюдение указывает на то, что именно интегральный показатель экспрессии ERCC1, характеризующий не только количество клеток, экспрессирующих маркер, но интенсивность экспрессии ERCC1 в каждой клетке, может быть наиболее информативным с точки зрения молекулярной диагностики.

На рис. 3 представлены кривые Каплана-Майера, которые демонстрируют корреляцию уровня, интенсивности и интегрального индекса экспрессии ERCC1 с продолжительностью безрецидивного периода после завершения I линии стандартной химиотерапии рака яичников препаратами платины и таксанами. Рассмотрена вероятность развития рецидива болезни в группах с высокой и низкой экспрессией ERCC1 — при разных показателях экспрессии ERCC1 ниже и выше медианы каждого из показателей по группе исследованных опухолей в целом.

Видно, что обратная зависимость между экспрессией ERCC1 и продолжительностью безрецидивного периода после завершения I линии химиотерапии выявляется при оценке экспрессии маркера по всем показателям. Так, в группах пациенток с низкими значениями уровня, интенсивности и интегрального индекса экспрессии ERCC1 медиана безрецидивного периода в течение 40 мес наблюдения не достигнута, а во всех группах с высокими показателями экспрессии маркера составила 9 мес. Различным было и количество рецидивов в группах с разной экспрессией ERCC1 в опухоли. К 40 мес наблюдения возврат болезни диагностирован: при низком и высоком уровне экспрессии маркера — в 26% vs 79% случаев; при низкой и высокой интенсивности экспрессии ERCC1 — в 47% vs 57% случаев; при высоких и низких значениях интегрального индекса — в 32% vs 74% опухолей. Во всех случаях разница между группами достигла высокой статистической значимости (указано на рис. 3).

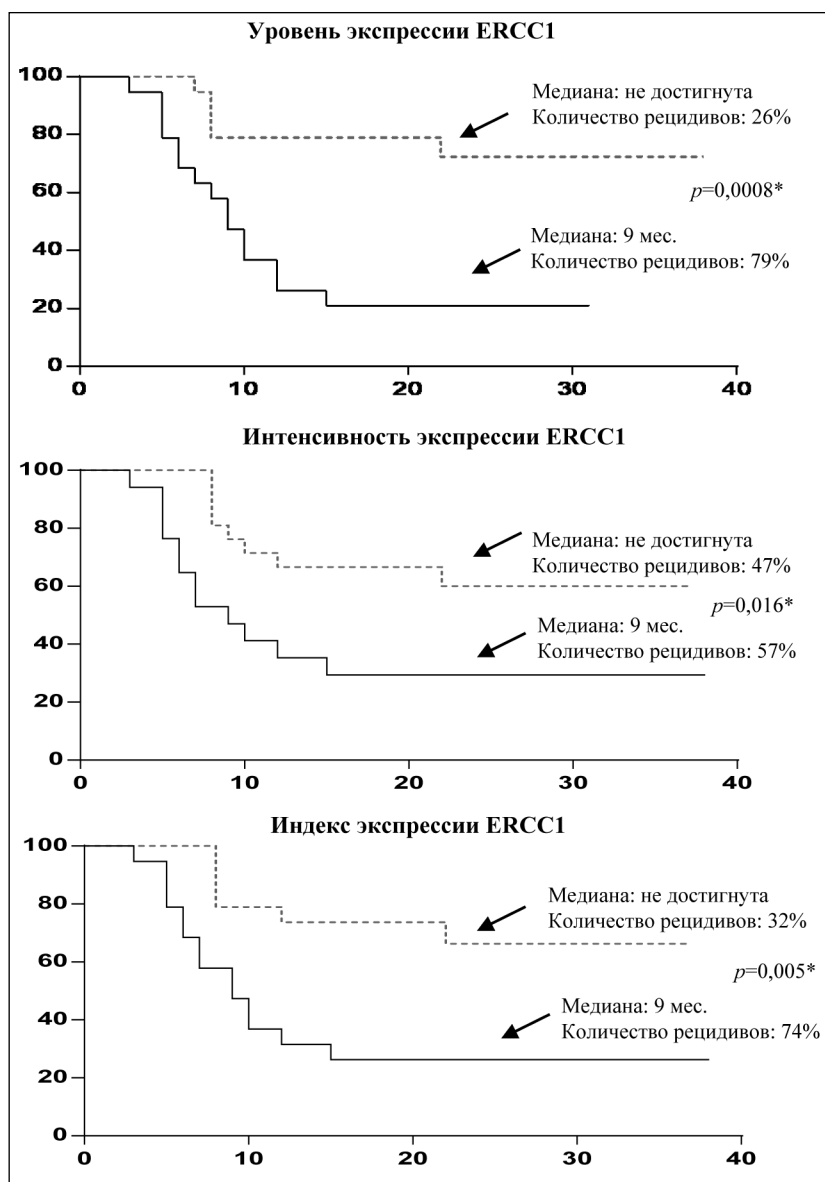


Рис. 3. Продолжительность безрецидивного периода после I линии химиотерапии препаратами платины и таксанами в зависимости от показателей экспрессии ERCC1.

По оси абсцисс — время наблюдения после окончания I линии химиотерапии препаратами платины и таксанами (мес). По оси ординат — вероятность возникновения рецидива (%). «---» — опухоли с высокой экспрессией ERCC1 ($\geq$ медианы каждого показателя экспрессии маркера по всем исследованным образцам опухолей). «—» — опухоли с низкой экспрессией ERCC1 ($<$ медианы для каждого показателя экспрессии маркера по всем исследованным образцам опухолей). * — различия между группами с высокой и низкой экспрессией ERCC1 во всех случаях статистически значимы ($p<0,05$).

Обсуждение результатов

Препараты платины в настоящий момент широко используются при лечении злокачественных опухолей различных локализаций, в том числе рака яичников. В 75—80% случаев рака яичников регистрируется чувствительность к I линии химиотерапии, включающей препараты платины и таксаны [6, 7], тогда как остальные больные в те-

чение 6 мес после окончания лечения переживают рецидив заболевания. Таким образом, каждой четвертой—пятой пациентке проводится заведомо неэффективная токсичная терапия, которая ухудшает качество жизни и отодвигает адекватное лечение, эффективность которого в значительной степени зависит от начала его проведения. В такой ситуации важность молекулярной диагностики опухоли до начала проведения терапии очевидна.

Вклад ERCC1 — белка эксцизионной репарации ДНК, в противоопухолевое действие препаратов платины доказан в многочисленных фундаментальных исследованиях [4]. Предположение о том, что ERCC1 может играть роль предиктивного фактора резистентности клеток к препаратам платины, было высказано еще в 1990-х годах [8]. Однако результаты клинических исследований вплоть до настоящего времени противоречивы. В одних работах связь активности репарации ДНК с эффектом терапии выявляется, в других — нет [9, 10]. Причин противоречивости много, и некоторые из них удалось преодолеть в настоящем исследовании.

Важнейший фактор неточности анализа — субъективность полуколичественной визуальной оценки результатов и гетерогенность опухоли по уровню экспрессии опухолевых маркеров, учесть которую при исследовании локального участка опухоли невозможно. Необходимость использования для молекулярной диагностики интегрального показателя по всему опухолевому узлу убедительно продемонстрирована при иммуногистохимическом исследовании 15 участков одного и того же образца немелкоклеточного рака лёгкого. Дискордантность показателей экспрессии опухолевых маркеров ERCC1, RRM1, TUBB-3 и Ki-67 при повторных исследованиях гистологических препаратов одних и тех же образцов опухоли выявлена в 33—67% случаев [11]. В последнее время проблемы молекулярной диагностики опухоли в связи с внутриопухолевой гетерогенностью обсуждаются во многих работах [12—14].

К аналитическим ошибкам иммуногистохимического анализа, который рутинно используется в клинических лабораториях, приводит и многостадийная преаналитическая подготовка материала, включающая недостаточно стандартизованные условия фиксации, дегидратации и гидратации опухолевой ткани, ревитализации антигена, контроля активности антител и т.д.

Этих серьёзных недостатков позволяет избежать использованный в настоящем исследовании иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией, в котором, прежде всего, значительно упрощена преаналитическая подготовка [15]. Анализ лишен субъективизма, позволяет строго количественно иссле-

довать более 10 тыс клеток из клеточных суспензий, которые получены из образцов опухолей большого размера (до 2 см и более в диаметре). Показатель экспрессии маркера при этом становится интегральным по большому объёму опухоли, что в значительной степени нивелирует внутриопухолевую гетерогенность.

Причиной разноречивости заключений о значимости ERCC1 в предсказании резистентности к препаратам платины является также отсутствие стандарта дизайна и оценки результатов исследований. Разнообразны объекты и методы исследования, при этом отличия в информативности разных характеристик маркера очевидны. Получено множество доказательств того, что оценка полиморфизмов гена ERCC1 и уровень мРНК ERCC1 не позволяют судить об уровне этого белка в клетке и об активности процесса эксцизионной репарации ДНК [9, 16, 17]. И это неудивительно, так как от экспрессии гена до синтеза белка большой путь, который может прерываться на разных его этапах.

И наконец, во многих работах заключение о значимости ERCC1 в прогнозе эффективности I линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины базируется на результатах оценки корреляции уровня экспрессии маркера с показателем общей выживаемости, которая зависит не только от эффективности первой платиносодержащей терапии, но и последующего лечения — часто без препаратов платины.

В настоящем исследовании учтены перечисленные выше факторы, влияющие на точность определения клинической значимости ERCC1, и проведена проспективная строго количественная оценка разных показателей экспрессии ERCC1 в ткани серозного рака яичников. Группы сравнения сформированы с учётом клинического стандарта деления опухолей на резистентные, условно чувствительные и чувствительные в зависимости от времени диагностирования рецидива болезни, соответственно, — в течение 6 мес, в период от 6 до 12 мес и после 12 мес после завершения I линии терапии препаратами платины и таксанами.

Статистически значимые различия между группами выявлены по всем исследованным показателям экспрессии ERCC1 — по уровню, интенсивности и интегральному индексу. При этом в ряду «резистентные опухоли → условно чувствительные → чувствительные» средние значения всех показателей экспрессии ERCC1 изменялись от большего к меньшему. Такая же закономерность продемонстрирована и при оценке методом Каплана—Мейера корреляции продолжительности безрецидивного периода после завершения I линии химиотерапии с уровнем, интенсивностью и интегральным индексом экспрессии ERCC1.

Во всех случаях различия достигли высокой статистической значимости, при этом выявлены различия и в числе рецидивов болезни, диагностированных к 40 мес наблюдения, то есть в агрессивности течения болезни.

Таким образом, в группе резистентных опухолей средние показатели экспрессии ERCC1 ниже по сравнению с группой условно чувствительных и чувствительных новообразований. Корреляция показателей экспрессии ERCC1 с прогнозом эффективности I линии терапии и агрессивностью течения болезни была аналогичной: чем ниже экспрессия ERCC1, тем ниже эффективность лечения и хуже прогноз болезни.

На первый взгляд, эти результаты не согласуются с фундаментальным представлением о вкладе ERCC1 в эффективность препаратов платины: при прочих равных условиях, чем активнее репарация повреждений ДНК, связанных с воздействием препаратов платины, тем их эффективность ниже. Однако в условиях клинического исследования именно «прочие равные условия» изменяются от пациентки к пациентке. В частности, важнейшим фактором, который снижает эффективность цисплатина, является анеуплоидия. В экспериментах на культуре клеток рака желудка и в опытах на животных с трансплантированной опухолью показано, что индукция в опухоли ДНК анеуплоидии вызывает выраженное снижение эффективности цисплатина по сравнению с исходным диплоидным вариантом опухоли [18]. Более того, анеуплоидия, выраженность которой контролируется репарацией ДНК, в том числе и с участием ERCC1, относится к прогностически неблагоприятным факторам прогноза большинства злокачественных новообразований, в том числе и в случае рака яичников [19].

Следовательно, в реальной клинической ситуации эффективность препаратов платины в связи с ERCC1 зависит не только от активности репарации повреждений ДНК, вызванных препаратом платины, но и от стабильности генома опухоли как такового. И эти биологические эффекты функционирования ERCC1 находятся в антагонистической позиции по отношению к эффективности препаратов платины.

Тем не менее, в настоящем исследовании получены чёткие корреляции, которые свидетельствуют о возможности прогнозировать продолжи-

тельности безрецидивного течения рака яичников после завершения I линии химиотерапии препаратами платины и таксанами по результатам строго количественной оценки экспрессии ERCC1. Тот факт, что неблагоприятным фактором прогноза является низкий уровень и интенсивность экспрессии ERCC1, на наш взгляд указывает на то, что генетическая стабильность — это одна из важнейших биологических характеристик рака яичников, определяющих эффективность платиносодержащей химиотерапии рака яичников и исход болезни.

С этим представлением согласуются результаты ряда исследований, выполненных в последнее время. Речь идет о сравнительной оценке выживаемости больных раком яичников с низким и высоким уровнем экспрессии ERCC1 по результатам полуквантитативного иммуногистохимического анализа опухолей. Выявлено статистически значимое увеличение общей выживаемости и продолжительности безрецидивного течения болезни в зависимости от уровня экспрессии в опухоли ERCC1 [3, 20]. Во всех случаях неблагоприятный прогноз был ассоциирован с низкой экспрессией ERCC1, и что очень важно — не зависел от проводимой химиотерапии, а следовательно, в большей степени зависел от биологических особенностей опухоли [21].

Подводя итог, необходимо отметить, что убедительность полученных в настоящем исследовании корреляций подчёркивает необходимость чёткой унификации изучения не только ERCC1, но и других молекулярных маркеров. Считаем, что строго количественный анализ должен проводиться по показателям экспрессии конечного продукта — белка. Оптимально — исследование должно быть проспективным. При оценке клинической значимости маркера в предсказании чувствительности к тому или иному противоопухолевому препарату — показатели эффективности терапии должны быть стандартизованы и общеприняты. В дальнейшем, для повышения точности прогноза эффективности I линии химиотерапии с включением препаратов платины, мы планируем оценить вклад в клинический молекулярный прогноз плоидности исследованных образцов рака яичников, а также экспрессии маркеров, ассоциированных с эффективностью таксанов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Steffensen K. D., Waldström M., Jakobsen A. The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 5: 820–825.
2. Lee S. M., Falzon M., Blackhall F. et al. Randomized prospective biomarker trial of ercc1 for comparing platinum and nonplatinum therapy in advanced non-small-cell lung cancer: ERCC1 trial (ET). *J Clin Oncol* 2017; 35: 4: 402–411.
3. Kang C. H., Jang B. G., Kim D. W. et al. The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and betaIII-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection. *Lung Cancer* 2010; 68: 3: 478–483.
4. Богущ Т. А., Попова А. С., Дудко Е. А. и др. ERCC1 как маркер резистентности рака яичников к препаратам платины. *Антибиотики и химиотер* 2015; 60: 3–4: 42–50. / Bogush T. A., Popova A. S., Dudko E. A. i dr. ERCC1 kak marker rezistentnosti raka yaichnikov k preparatam platiny. *Antibiotiki i khimioter* 2015; 60: 3–4: 42–50. [in Russian]
5. Богущ Т. А., Шатурова А. С., Дудко Е. А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов — в солидных опухолях человека. *Вестн Моск ун-та Сер 2, Химия* 2011; 52: 4: 305–312. / Bogush T. A., Shaturova A. S., Dudko E. A. i dr.

- Kolichestvennaja immunofluorescentnaja ocenka s ispol'zovaniem protchnoj citofluorimetrii jekspressii jestrogenovykh receptorov — v solidnykh opukholjakh cheloveka. Vestn Mosk un-ta Ser 2, Khimija 2011; 52: 4: 305—312. [in Russian]
6. *Deloia J. A., Bhagwat N. R., Darcy K. M. et al.* Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. *Gynecol Oncol* 2012; 126: 3: 448—454.
 7. *Syrios J., Banerjee S., Kaye S. B.* Advanced epithelial ovarian cancer: from standard chemotherapy to promising molecular pathway targets — where are we now? *Anticancer Res* 2014; 34: 5: 2069—2077.
 8. *Lee K. B., Parker R. J., Bohr V. et al.* Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. *Carcinogenesis* 1993; 14: 10: 2177—2180.
 9. *Bösmüller H., Haitchi-Petnehazy S., Webersinke G. et al.* Intratumoral lymphocyte density in serous ovarian carcinoma is superior to ERCC1 expression for predicting response to platinum-based therapy. *Virchows Arch* 2011; 459: 2: 183—191.
 10. *Xie C., Yin R. T., Li Y. L. et al.* The protein expression of ERCC1 and survivin in epithelial ovarian carcinoma and their clinical significance. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2011; 42: 1: 86—89.
 11. *Cepeda V., Fuentes M. A., Castilla J. et al.* Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7: 1: 3—18.
 12. *Colombo P. E., Fabbro M., Theillet C. et al.* Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89: 2: 207—216.
 13. *Богущ Т. А., Попова А. С., Дудко Е. А. и др.* Дискордантность статуса эстрогеновых рецепторов между первичным и метастатическим раком молочной железы — возможные причины и прогностическая значимость. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 7—8: 11—18. / *Bogush T. A., Popova A. S., Dudko E. A. i dr.* Diskordantnost' statusa jestrogenovykh receptorov mezhdu pervichnym i metastaticheskim rakom molochnoj zhelezy — vozmozhnye prichiny i prognosticheskaja znachimost'. *Antibiotiki i khimioter* 2013; 58: 7—8: 11—18. [in Russian]
 14. *Tolles J., Bai Y., Baquero M. et al.* Optimal tumor sampling for immunostaining of biomarkers in breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 2011; 13: 3: R51.
 15. *Богущ Т. А., Дудко Е. А., Родионова М. В. и др.* Анализ информативности методов иммуногистохимии и проточной цитофлуориметрии при оценке экспрессии эстрогеновых рецепторов альфа. *ДАН* 2015; 465: 2: 235—40. / *Bogush T. A., Dudko E. A., Rodionova M. V. i dr.* Analiz informativnosti metodov immunogistokhimii i protchnoj citofluorimetrii pri ocenke jekspressii jestrogenovykh receptorov al'fa. *DAN* 2015; 465: 2: 235—40. [in Russian]
 16. *Moxley K. M., Benbrook D. M., Queimado L. et al.* The role of single nucleotide polymorphisms of the ERCC1 and MMS19 genes in predicting platinum-sensitivity, progression-free and overall survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2013; 130: 2: 377—382.
 17. *Marsh S., Paul J., King C. R., Gifford G. et al.* Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: the Scottish randomised trial in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 29: 4528—4535.
 18. *Tang X., Hu G., Xu C. et al.* HZ08 reverse the aneuploidy-induced cisplatin-resistance in Gastric cancer by modulating the p53 pathway. *Eur J Pharmacol* 2013; 720: 1—3: 84—97.
 19. *Danielsen H. E., Pradhan M., Novelli M.* Revisiting tumour aneuploidy — the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13: 5: 291—304.
 20. *Klatte T., Seitz C., Rink M. et al.* ERCC1 as a Prognostic and Predictive Biomarker for Urothelial Carcinoma of the Bladder following Radical Cystectomy. *J Urol* 2015; 194: 5: 1456—1462.
 21. *Wang J., Zhou X. Q., Li J. Y. et al.* Prognostic significance of ERCC1 expression in postoperative patients with gastric cancer. *Chin J Cancer Res* 2014; 26: 3: 323—330.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Богущ Татьяна Анатольевна — д. б. н., профессор, заведующая лабораторией медицинской химии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Стенина Марина Борисовна — д. м. н., ведущий научный сотрудник, отделение клинической фармакологии и химиотерапии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Богущ Елена Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник, хирургическое отделение №2 (диагностика опухолей), ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Заркуа Варлам Тенгизович — аспирант, отделение клинической фармакологии и химиотерапии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Калужный Сергей Андреевич — младший научный сотрудник, лаборатория медицинской химии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Мамичев Иван Андреевич — младший научный сотрудник, лаборатория медицинской химии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Тюляндина Александра Сергеевна — к. м. н., старший научный сотрудник отделения клинической фармакологии и химиотерапии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Тюляндин Сергей Алексеевич — д. м. н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Потенциальные возможности мониторинга концентрации прокальцитонина при проведении антибактериальной терапии инфекций нижних дыхательных путей

* Н. Б. ЛАЗАРЕВА¹, М. В. ЖУРАВЛЕВА¹, А. Б. ПРОКОФЬЕВ¹, Е. В. ШИХ²

¹ Первый Московский медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

² Центр клинической фармакологии ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

Potential Possibilities of Monitoring the Procalcitonin Concentration During Antibacterial Therapy of Lower Respiratory Tract Infections

* N. B. LAZAREVA¹, M. V. ZHURAVLEVA¹, A. B. PROKOFIEV¹, E. V. SHIKH²

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Растущий уровень резистентности микроорганизмов требует критического снижения случаев необоснованного применения антибиотиков и сокращения общей продолжительности антибактериальной терапии. Контролируемые клинические исследования, проведённые в последние годы, подтвердили высокую эффективность использования теста на прокальцитонин (B·R·A·H·M·S PCT™) в отношении уменьшения случаев необоснованного назначения и сокращения сроков проведения антибактериальной терапии. В этой связи тест на прокальцитонин способствует персонализации подходов к проведению антибактериальной терапии. Благодаря определению уровня прокальцитонина (B·R·A·H·M·S PCT™) возможно добиться существенного снижения частоты проведения эмпирической антибактериальной терапии в ситуациях низкого риска (бронхиты, обострения ХОБЛ). В более тяжёлых клинических ситуациях (пневмония, сепсис) мониторинг концентрации прокальцитонина позволяет сократить сроки проведения антибактериальной терапии.

Ключевые слова: инфекции дыхательных путей, прокальцитонин, антибактериальная терапия

The growing level of resistance of microorganisms requires a critical reduction in cases of unreasonable use of antibiotics and a reduction in the overall duration of antibiotic therapy. Controlled clinical trials conducted in recent years have confirmed the high effectiveness of the use of the procalcitonin test (B·R·A·H·M·S PCT™) in reducing the occurrence of unjustified prescribing of antibiotic therapy and reducing its duration. In this regard, procalcitonin test promotes the personalization of approaches to antibiotic therapy. It is possible to significantly reduce the frequency of empirical antibiotic therapy in low-risk situations (bronchitis, exacerbation of COPD) by determining the level of procalcitonin (B·R·A·H·M·S PCT™). Monitoring the concentration of procalcitonin allows shortening of the duration of antibiotic therapy in more severe clinical situations (pneumonia, sepsis).

Keywords: respiratory tract infections, procalcitonin, antibacterial therapy

В условиях реальной клинической практики врачи регулярно сталкиваются с необходимостью диагностики и лечения заболеваний дыхательных путей инфекционной природы. Инфекции дыхательных путей (бронхит, внебольничная пневмония, обострения хронической обструктивной болезни лёгких) являются ключевым драйвером назначения антибиотиков (в т.ч. необоснованного) и, как следствие, вносят основной вклад в развитие проблемы антибиотикорезистентности. При этом всегда приходится решать вопрос о целесо-

образности назначения антибиотиков, а в случае их применения необходимо иметь информацию об эффективности проводимой терапии.

Диагностика инфекций респираторного тракта в основном полагается на клинические критерии (кашель, одышка, повышение температуры тела) и рентгенографию лёгких [1]. Микробиологические (культуральные) и молекулярные (ПЦР) методы не позволяют с высокой долей уверенности исключить бактериальную инфекцию. Клинических данных, как правило, недостаточно для принятия обоснованного решения о необходимости назначения эмпирической терапии, контроле эффективности и сроках прекращения проводимой антибактериальной терапии. С дру-

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции:

E-mail: natalia.lazareva@gmail.com

гой стороны, задержка в назначении адекватной антибиотикотерапии при тяжёлых бактериальных инфекциях приводит к генерализации инфекционного процесса и развитию сепсиса, что негативно влияет на прогноз заболевания и многократно увеличивает затраты на лечение.

В этой связи особую актуальность приобретает определение биохимических маркёров, которые позволяют максимально рано диагностировать бактериальные инфекции, оценивать тяжесть течения, эффективность проводимой антибактериальной терапии и прогнозировать исход при тяжёлых инфекциях. На сегодняшний момент в мировой клинической практике наибольшая доказательная база, касающаяся эффективности применения в качестве биологического маркёра бактериальной инфекции, а также мониторинга проводимой антибактериальной терапии, накоплена для прокальцитонина. Именно уровень прокальцитонина может служить показателем этиологии инфекции и руководством для принятия решения о назначении антибиотиков.

Прокальцитонин (ПКТ) был открыт в 1984 г. как предшественник (прогормон) кальцитонина. Прокальцитонин представляет собой гликопротеин, состоящий из 116 аминокислот, молекулярная масса — 14,5 кДа. Кальцитонин — пептидный гормон, синтезируемый преимущественно парафолликулярными С-клетками щитовидной железы, а также в небольшом количестве и в других органах, наиболее заметно — в лёгких. Кальцитонин обладает гипокальциемическим эффектом за счёт ингибирования активности остеокластов, снижения скорости костной резорбции, снижения реабсорбции кальция в почках и уменьшения абсорбции кальция в кишечнике. Кальцитонин понижает почечную реабсорбцию фосфатов, вызывая умеренное снижение фосфора крови. Исходная белковая молекула, из которой путём протеолиза образуется сначала прокальцитонин, а потом уже из него кальцитонин — это препрокальцитонин [2].

Повышение концентрации прокальцитонина происходит специфично при бактериальных инфекциях и сепсисе. При грибковых и вирусных инфекциях, при аллергических и аутоиммунных заболеваниях уровень прокальцитонина, как правило, не повышается, что позволяет использовать этот тест с дифференциально-диагностической целью [3]. Синтез ПКТ индуцируется эндотоксинами бактерий, однако такой индукции предшествует повышение уровней провоспалительных цитокинов, в особенности ИЛ-6 и ФНО-альфа. Повышение уровня ПКТ наступает через короткое время после пикового повышения провоспалительных цитокинов. При развитии инфекционного процесса ПКТ вырабатывается вне щитовидной железы: в различных органах (в печени,

почках, в адипоцитах и в мышцах) разными типами клеток, в частности, паренхимальными. При моделировании сепсиса на лабораторных хомяках мРНК прокальцитонина обнаружена во многих органах. При развитии бактериальной инфекции молекула ПКТ выделяется в кровоток и уровень ПКТ в крови возрастает, при этом уровень кальцитонина не повышается [4].

Определение уровня прокальцитонина (В·R·А·Н·М·S PCT™) в плазме крови получило широкое распространение благодаря результатам исследований, продемонстрировавшим очень быстрое повышение содержания этого биохимического маркёра в ответ на бактериальную инфекцию: уже в первые 2—6 ч от начала заболевания с достижением максимальных значений в течение 24 ч. Период полураспада прокальцитонина составляет 25—35 ч, что позволяет быстро отследить снижение уровня при улучшении состояния пациента. Именно поэтому тест на прокальцитонин в большей степени, нежели С-реактивный белок, может быть использован для мониторинга течения заболевания [5]. Внутривенное введение эндотоксина здоровым добровольцам вызывало быстрый синтез прокальцитонина. При этом уровень ПКТ возрастает уже через 3 ч, после введения стандартизованного эндотоксина, а резкий подъём уровня происходит через 12—18 ч. В отсутствие антибактериальной инфекции уровень прокальцитонина может повышаться у пациентов с тяжёлыми травмами и после хирургических вмешательств [6, 7]. Однако при данных обстоятельствах уровень прокальцитонина быстро снижается при улучшении состояния. Замедленное снижение уровня прокальцитонина наблюдается у пациентов с хронической почечной недостаточностью [8].

В марте 2017 г. FDA (US Food and Drug Administration, США) опубликовало пресс-релиз о расширении показаний теста на прокальцитонин (В·R·А·Н·М·S PCT™) в отношении определения необходимости назначения эмпирической антибактериальной терапии у пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей и решении о прекращении антибактериальной терапии у пациентов с сепсисом. Одним из оснований для расширения рекомендаций по использованию теста на прокальцитонин (В·R·А·Н·М·S PCT™) стали результаты опубликованного в 2017 г. метаанализа, целью которого было определение эффективности применения данного теста в качестве руководства для принятия решения о назначении антибиотиков при инфекциях нижних дыхательных путей, сокращении продолжительности проводимой антибактериальной терапии и влиянии на уровень летальности у таких пациентов [9].

Исследователи провели систематический поиск в Центральном Кокрановском регистре, базах данных MEDLINE и Embase — всего критери-

Таблица 1. Ключевые клинические исследования, посвящённые использованию теста на прокальцитонин (В·Р·А·Н·М·S PCT™) при инфекциях дыхательных путей

Тип инфекции	Дизайн исследования	Пограничный уровень ПСК, мкг/л (бактериальная инфекция отсутствует)	Основные выводы	Источник
Обострение ХОБЛ	РКИ* (120 пациентов)	<0,25	Определение уровня PCT способствует снижению необоснованного назначения антибиотиков	11
Обострение ХОБЛ	Метаанализ	<0,25	Определение уровня PCT способствует снижению необоснованного назначения антибиотиков	12
Бронхит	РКИ, регистры пациентов в условиях реальной клинической практики	<0,1—0,25	Определение уровня PCT способствует снижению необоснованного назначения антибиотиков	13
Обострение бронхиальной астмы	РКИ (216 пациентов)	<0,25	Определение уровня PCT способствует снижению необоснованного назначения антибиотиков	14
Внебольничная пневмония	РКИ, метаанализ (4467 пациентов), регистры пациентов в условиях реальной клинической практики	<0,1—0,25; 80—90% снижение	Измерение концентрации PCT в динамике способствует уменьшению продолжительности курса антибактериальной терапии	15
Инфекции верхних дыхательных путей	РКИ (458 пациентов)	<0,1—0,25	Определение уровня PCT способствует снижению необоснованного назначения антибиотиков (амбулаторное звено)	16
Острые инфекции верхних дыхательных путей	РКИ (702 пациента)	<0,1—0,25	Определение уровня PCT способствует снижению необоснованного назначения антибиотиков (амбулаторное звено)	17

Примечание. * РКИ — рандомизированное клиническое исследование.

ям соответствия отвечали 26 исследований с общим числом пациентов 6708 человек. Большинство исследований включало госпитализированных пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей и сепсисом, обусловленным инфекциями нижних дыхательных путей. Также в обобщённый анализ были включены два клинических исследования, включавших амбулаторных пациентов с инфекциями верхних и нижних дыхательных путей. Назначение терапии в зависимости от уровня прокальцитонина (В·Р·А·Н·М·S PCT™) привело к меньшему количеству назначений антибиотиков, продолжительности антибиотикотерапии (5,7 vs. 8,1 дня [95% CI –2,71–2,15], $p<0,0001$), сокращению числа побочных эффектов, связанных с антибиотиками (16% vs. 22%; OR 0,68 [95% CI 0,57–0,82], $p<0,0001$). В целом смертность в течение 30 дней была ниже при терапии, управляемой на основании динамики прокальцитонина, чем в контрольной группе (9% vs. 10%; OR 0,83 [95% CI 0,70–0,99], $p=0,037$). Авторы данного метаанализа приходят к заключению, что внедрение в протоколы лечения пациентов с респираторными инфекциями с обязательной оценкой уровня прокальцитонина имеет значительный потенциал, связанный, в первую очередь, с улучшением результатов лечения, а также со снижением отрицательного воздействия антибиотиков и риска развития последующей резистентности микроорганизмов.

На протяжении нескольких последних лет (2011—2016 гг.) были опубликованы результаты нескольких крупных клинических исследований, подтвердивших пользу определения уровня прокальцитонина (В·Р·А·Н·М·S PCT™) при острых инфекциях нижних дыхательных путей (табл. 1) [10].

В 2012 г. Кокрейновским сообществом был опубликован метаанализ, базирующийся на данных 14 рандомизированных клинических исследований, сфокусированных на определении концентрации прокальцитонина у пациентов с инфекциями респираторного тракта. Данный метаанализ выявил, что определение уровня прокальцитонина способствует резкому снижению назначения эмпирической антибактериальной терапии (60—70%) при нетяжёлых инфекциях респираторного тракта (бронхиты, инфекции верхних дыхательных путей, обострения ХОБЛ) [18]. В случае более тяжёлых инфекций (внебольничная пневмония) мониторинг концентрации прокальцитонина способствовал уменьшению средней продолжительности курса антибиотиков (на 40% у пациентов с внебольничной пневмонией, на 25% у пациентов с сепсисом, вследствие пневмонии, госпитализированных в ОИТ).

В 2016 г. опубликованы результаты рандомизированного исследования, подтвердившего высокую ценность использования прокальцитонина в качестве инструмента принятия решения о целесообразности назначения эмпирической терапии

пациентам с обострениями ХОБЛ, а также определения продолжительности курса антибактериальной терапии. Так, при проведении мониторинга концентрации прокальцитонина средняя продолжительность курса антибактериальной терапии составила 3,5 дня против 8,5 дней в контрольной группе. При этом сокращение курса антибактериальной терапии не оказывало негативного влияния на общую продолжительность заболевания и уровень летальности. Следует подчеркнуть, что для мониторинга состояния и оценки эффективности проводимой антибактериальной терапии необходимо использовать количественные методы измерения (иммунолюминиметрические тесты) концентрации прокальцитонина в плазме крови. В то время как полуколичественный иммунохроматографический тест с 30-минутным периодом инкубации BRAHMS PCT-Q чаще используются для быстрого получения результатов (диапазон измерения $<0,5$; $0,5-2$; $2-10$ и >10 мкг/л) вне лаборатории, без применения дополнительной аппаратуры и участия специального медицинского персонала. В настоящее время он в основном используется для диагностики бактериальных инфекций в амбулаторных условиях.

Тяжёлое обострение бронхиальной астмы представляет собой потенциально опасное состояние и приводит к повышению риска госпитализации пациентов в реанимационное отделение. Принято считать, что большинство обострений бронхиальной астмы связано с вирусными инфекциями дыхательных путей, а бактериальные агенты обычно играют гораздо меньшую роль, в этой связи международные рекомендации по лечению бронхиальной астмы не включают применение антибиотиков в качестве стандартной терапии для лечения обострений. Несмотря на это во многих странах традиционно предпочитают лечить обострение бронхиальной астмы с помощью антибактериальных препаратов, что непременно приводит к росту резистентности бактерий. К примеру, в США примерно 22% пациентов с обострением бронхиальной астмы получают антибиотики в отделении интенсивной терапии без существенных показаний. В Великобритании также наблюдается большая частота назначений антибактериальных препаратов во время обострений бронхиальной астмы (57%). В Китае эти показатели достигают 70%. В этой связи учёные из Китая провели исследование с целью выяснить, возможно ли использовать тест на прокальцитонин в качестве маркера, позволяющего эффективно и безопасно определить потребность в проведении антибиотикотерапии при обострениях бронхиальной астмы и, таким образом, снизить частоту ненужных назначений. Рандомизированное клиническое исследование, проведённое в 2014 г. в Китае, продемонстрировало высокую ценность

определения концентрации прокальцитонина у пациентов с обострениями бронхиальной астмы при принятии решения о необходимости назначения антибактериальной терапии. Отмечено снижение частоты назначения антибиотиков (48,9% vs. 87,8%) и продолжительности курса (относительный риск 0,56, ДИ 0,44–0,70) [19]. Существенных различий в длительности и частоте госпитализаций, динамике лабораторных и спирометрических показателей при сравнении двух групп пациентов не наблюдалось. Количество обострений, госпитализаций в отделения интенсивной терапии и необходимость приёма кортикостероидов также были схожи в обеих группах на протяжении проведения исследования. Таким образом, измерение уровня прокальцитонина в сыворотке крови позволяет снизить частоту применения антибиотиков у пациентов с тяжёлым обострением бронхиальной астмы и может быть использовано в клинической практике.

Особый интерес представляют исследования, посвящённые возможностям применения теста на прокальцитонин в условиях «реальной клинической практики». Исследование ProREAL включало 1759 пациентов из Швейцарии, Франции и США. Продолжительность антибактериальной терапии при лечении инфекций дыхательных путей была достоверно ниже при мониторинге концентрации прокальцитонина (5,9 vs. 7,4 дней; 95% OR 2,04 – 0,98; $p < 0,001$). Другое исследование проанализировало две популяции: 33569 пациентов с динамическим измерением ПКТ и 98543 пациентов группы контроля [20]. Определение ПКТ в динамике ассоциировалось с достоверным снижением общих сроков госпитализации, продолжительности нахождения пациентов в ОИТ, снижением стоимости госпитализации и общей продолжительности использования ОИТ. Результаты, полученные в условиях реальной клинической практики, подтверждают результаты, полученные при проведении рандомизированных клинических исследований, и подтверждают высокую ценность определения концентрации прокальцитонина у пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей.

Таким образом, по причине высокой специфичности ПКТ по отношению к бактериальной инфекции, анализ ПКТ помогает дифференцировать пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей, которым требуется антибиотикотерапия, и пациентов с вирусной инфекцией, не требующих введения антибиотиков. Не рекомендуется назначать антибиотики пациентам с клиническими признаками инфекции, имеющим низкий уровень прокальцитонина (табл. 2) [21].

Несколько рандомизированных контролируемых клинических исследований продемонстрировали возможность индивидуального выбора продолжительности антибактериальной терапии для

Таблица 2. Потребность в назначении антибиотикотерапии в зависимости от уровня концентрации прокальцитонина (В·Р·А·Н·М·S PCT™)

Уровень ПКТ	Рекомендации
ПКТ < 0,1 мкг/мл	Использование антибиотиков не показано,
Указывает на отсутствие бактериальной инфекции	в т.ч. при обострениях ХОБЛ
ПКТ ≥ 0,1—<0,25 мкг/мл	Использование антибиотиков не показано
Наличие бактериальной инфекции маловероятно	
ПКТ ≥ 0,25—<0,5 мкг/мл	Рекомендуется начать антибактериальную терапию
Бактериальная инфекция возможна	
ПКТ ≥ 0,5 мкг/мл	Необходимо начать антибактериальную терапию
Бактериальная инфекция присутствует	

Примечание. * — различия между показателями в группах сравнения статистически значимы ($p < 0,05$).

каждого пациента посредством контроля концентрации ПКТ на протяжении курса антибактериальной терапии (повторить анализ ПКТ на 3-, 5- и 7-й дни). Рекомендуется прекратить антибиотикотерапию, когда уровень ПКТ опустился на 80—90% от пикового значения, и настоятельно рекомендуется прекратить введение антибиотика, когда уровень ПКТ опустился ниже 0,1 мкг/мл [22].

Важно отметить, что тест на прокальцитонин должен быть использован только в контексте клинической и микробиологической оценки пациента. Поскольку кинетика прокальцитонина имеет важное диагностическое и прогностическое значение в отношении тяжести течения и исхода заболевания, должны проводиться повторные измерения биомаркера. Это особенно важно для пациентов без признаков клинического улучшения, а также при проведении длительной антибактериальной терапии [23]. Уровень прокальцитонина может быть низким на ранних фазах инфекционного процесса или при локализованной инфекции, в дальнейшем у таких пациентов будет отмечаться прирост уровня прокальцитонина. В этой связи особую важность приобретает повторное измерение уровня прокальцитонина, в частности, в случае неопределённости. Несколько исследований подтвердили экономическую целесообразность определения прокальцитонина у пациентов с респираторными инфекциями, связанную с ограничением назначения и длительности применения антибактериальных препаратов [24].

Заключение

Растущий уровень резистентности микроорганизмов требует критического снижения случа-

ев необоснованного применения антибиотиков и сокращения общей продолжительности антибактериальной терапии [25]. Контролируемые клинические исследования, проведённые в последние годы, подтвердили высокую эффективность использования теста на прокальцитонин в отношении уменьшения случаев необоснованного назначения и сокращения сроков проведения антибактериальной терапии. Значительно возросший в последние годы объём публикаций, посвящённых вопросам использования теста на прокальцитонин, позволяет говорить о формировании более рациональных, персонализированных подходов к проведению антибактериальной терапии. Благодаря определению уровня прокальцитонина возможно добиться существенного снижения частоты проведения эмпирической антибактериальной терапии в ситуациях низкого риска (бронхиты, обострения ХОБЛ). В более тяжёлых клинических ситуациях (пневмония, сепсис) мониторинг концентрации прокальцитонина позволяет сократить сроки проведения антибактериальной терапии. Стратегии назначения, проведения и прекращения антибактериальной терапии под контролем уровня прокальцитонина безопасны в отношении возможного увеличения риска летальности, реинфекции, неэффективности проводимой антибактериальной терапии. Таким образом, более широкое внедрение в клиническую практику мониторинга концентрации прокальцитонина позволит улучшить диагностику бактериальных инфекций, даст возможность контролировать эффективность проводимой терапии, а также принимать решения относительно прекращения антибактериальной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Musher D.M., Thorne A.R. Community-acquired pneumonia. *New Engl J Med.* 2014; 371 (17): 1619—1628.
2. Meisner M., Dresden-Neustadt S.K. UNI-MED. Procalcitonin-Biochemistry and Clinical Analysis 1st edition. 2010.
3. Linscheid P., Seboek D., Nylen E.S. *et al.* In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology.* 2003; 144 (12): 5578—5584.
4. Maruna P., Nedelnikova K., Gurlich R. Physiology and Genetics of Procalcitonin. *Physiol Res* 2000; 49: Suppl 1: 57—61.
5. Dubos F., Korezowski B., Aygun D.A. *et al.* Serum procalcitonin level and other biological markers to distinguish between bacterial and aseptic meningitis in children: a European multicenter case cohort study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008; 1629 (12): 1157—1163.

6. Uzzan B., Cohen R., Nicolas P., Cucherat M., Perret G.Y. 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.
7. Hunziker S., Hugle T., Schuchardt K., Groeschl I., Schuetz P., Mueller B., Dick W., Eriksson U., Trampuz A. The value of serum procalcitonin level for differentiation of infectious from noninfectious causes of fever after orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 2010; 92 (1): 138—148.
8. Christ-Crain M., Muller B. Procalcitonin in bacterial infections—hope, more or less? *Swiss Med Wkly* 2005; 135 (31—32): 451—460.
9. Schuetz P., Wirz Ya., Christ-Crain M. *et al.* Effect of procalcitonin-guided antibiotic treatment on mortality in acute respiratory infections: a patient level meta-analysis. *The Lancet. Infectious Diseases.* 2017; 18: 1: 95—107. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30592-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30592-3)

10. Schuetz P., Wirz Ya., Christ-Crain M. et al. Effect of procalcitonin-guided antibiotic treatment on mortality in acute respiratory infections: a patient level meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases* 2016; 18: 1: 95–107. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30592-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30592-3)
11. Schuetz P., Briel M., Christ-Crain M., Stolz D., Bouadma L., Wolff M., Luyt C.E., Chastre J., Tubach F., Kristoffersen K.B. et al. Procalcitonin to guide initiation and duration of antibiotic treatment in acute respiratory infections: an individual patient data meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; 55 (5): 651–662.
12. Corti C., Fally M., Fabricius-Bjerre A., Mortensen K., Jensen B.N., Andreassen H.F., Porsbjerg C., Knudsen J.D., Jensen J.U. Point-of-care procalcitonin test to reduce antibiotic exposure in patients hospitalized with acute exacerbation of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016; 11: 1381–1389.
13. Albrich W.C., Dusemund F., Bucher B., Meyer S., Thomann R., Kuhn F., Bassetti S., Sprenger M., Bachli E., Sigris T. et al. Effectiveness and safety of procalcitonin-guided antibiotic therapy in lower respiratory tract infections in «real life»: an international, multicenter poststudy survey (ProREAL). *Arch Intern Med* 2012; 172 (9): 715–722.
14. Long W., Li L.J., Huang G.Z., Zhang X.M., Zhang Y.C., Tang J.G., Zhang Y., Lu G. Procalcitonin guidance for reduction of antibiotic use in patients hospitalized with severe acute exacerbations of asthma: a randomized controlled study with 12-month follow-up. *Crit Care* 2014; 18 (5): 471.
15. Schuetz P., Briel M., Christ-Crain M., Stolz D., Bouadma L., Wolff M., Luyt C.E., Chastre J., Tubach F., Kristoffersen K.B. et al. Procalcitonin to guide initiation and duration of antibiotic treatment in acute respiratory infections: an individual patient data meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; 55 (5): 651–662.
16. Burkhardt O., Ewig S., Haagen U., Giersdorf S., Hartmann O., Wegscheider K., Hummers-Pradier E., Welte T. Procalcitonin guidance and reduction of antibiotic use in acute respiratory tract infection. *Eur Respir J* 2010; 36 (3): 601–607.
17. Briel M., Schuetz P., Mueller B., Young J., Schild U., Nusbaumer C., Periat P., Bucher H.C., Christ-Crain M. Procalcitonin-guided antibiotic use vs a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care. *Arch Intern Med* 2008; 168 (18): 2000–2007. discussion 2007–2008.
18. Schuetz P., Muller B., Christ-Crain M., Stolz D., Tamm M., Bouadma L., Luyt C.E., Wolff M., Chastre J., Tubach F. et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 9 (9): CD007498.
19. Bafadhel M., Clark T.W., Reid C., Medina M.J., Batham S., Barer M.R., Nicholson K.G., Brightling C.E. Procalcitonin and C-reactive protein in hospitalized adult patients with community-acquired pneumonia or exacerbation of asthma or COPD. *Chest* 2011; 139 (6): 1410–1418.
20. Balk R.A., Kadri S.S., Cao Z., Robinson S.B., Lipkin C., Bozzette S.A. Effect of procalcitonin testing on healthcare utilization and costs in critically ill patients in the United States. *Chest* 2017; 151 (1): 23–33.
21. Schuetz P. et al. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8 (5): 575–587.
22. Kopterides P. et al. *Crit Care Med* 2010; 38 (11): 2229–2241.
23. Bouadma L., Luyt C.E., Tubach F., Cracco C., Alvarez A., Schwebel C. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010 Feb 6; 375 (9713): 463–474.
24. Schuetz P., Balk R., Briel M., Kutz A., Christ-Crain M., Stolz D., Bouadma L., Wolff M., Kristoffersen K.B., Wei L. et al. Economic evaluation of procalcitonin-guided antibiotic therapy in acute respiratory infections: a US health system perspective. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53 (4): 583–592.
25. Whitney C.G., Farley M.M., Hadler J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *New Engl J Med* 2000; 343 (26): 1917–1924.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лазарева Наталья Борисовна — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Первый Московский медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Журавлева Марина Владимировна — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Первый Московский медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России; зам. директора Центра клинической фармакологии ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

Прокофьев Алексей Борисович — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Первый Московский медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России; директор Центра клинической фармакологии ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

Ших Евгения Валерьевна — д. м. н., доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, директор Института профессионального образования ГБОУ ВПО Первый Московский медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

Современные направления профилактики внебольничной пневмонии у военнослужащих, проходящих военную службу по призыву

С. А. ПАРФЕНОВ¹, Е. Ю. БОРОВКОВ¹, А. Г. ШАГВАЛИЕВ¹, И. А. ТУЧИН², В. Г. БЕЛОВ¹, Ю. А. ПАРФЕНОВ¹

¹ Северо-Западный институт управления Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте Российской Федерации, Санкт-Петербург

² Войсковая часть 3526 Федеральной службы войск национальной гвардии Российской Федерации

Modern Directions of Prophylaxis of Community-Acquired Pneumonia Among Soldier Undergoing Military Service on Conscription

S. A. PARFENOV¹, E. YU. BOROVKOV¹, A. G. SHAGVALIEV¹, I. A. TUCHIN², V. G. BELOV¹, YU. A. PARFENOV¹

¹ North-West Institute of Management, branch of RANEPA, St. Petersburg

² Military unit 3526 of the National Guard Forces Command of the Russian Federation

Проблема заболеваемости органов дыхания является одной из самых актуальных не только для гражданской, но и для военной медицины. В период с 2004 по 2013 гг. количество обращений военнослужащих за медицинской помощью в более 50% случаев было связано с болезнями органов дыхания. В настоящее время для профилактики респираторных заболеваний применяются вакцины «Пневмо-23» и «Гриппол», однако отсутствуют убедительные данные о снижении уровня заболеваемости внебольничной пневмонией, при этом наблюдается тенденция к стабилизации показателей заболеваемости органов дыхания на достаточно высоком уровне. Проведённые исследования свидетельствуют о возможности улучшения эпидемиологической ситуации с внебольничной пневмонией у военнослужащих за счёт применения цитофлавина, приводящего к уменьшению количества и улучшению реологических свойств мокроты, поддержанию на должном уровне показателей местного иммунитета. Эти эффекты препарата способствуют сокращению длительности лечения и повышению реабилитационного потенциала пациента, в том числе и при внебольничной пневмонии.

Ключевые слова: Вооруженные Силы, эпидемиология, внебольничная пневмония, профилактика, цитофлавин.

The problem of the incidence of respiratory diseases is one of the most important not only for civil but also for military medicine. During the period from 2004 to 2013, more than fifty percent of servicemen's requests for medical assistance were associated with respiratory diseases. «Pneumo-23» and «Grippol» vaccines are currently used for the prevention of respiratory diseases; however there is no convincing data on the reduction of the incidence of community-acquired pneumonia, but there is a tendency to stabilize respiratory rates at a fairly high level. The conducted studies have shown the possibility of improving the epidemiological situation with community-acquired pneumonia among military personnel due to the use of cytoflavin, which leads to a reduction in the quantity and improvement of rheological properties of sputum, and maintenance of local immunity at the proper level. These effects of the drug reduce the duration of treatment and increase the rehabilitation potential of the patient, including the cases of community-acquired pneumonia.

Keywords: Armed Forces, epidemiology, community-acquired pneumonia, prevention, cytoflavin.

Введение

В настоящее время болезни органов дыхания (БОД) продолжают оставаться в центре внимания мировой медицины из-за своей широкой распространённости. По данным Всемирной организации здравоохранения, заболеваемость болезнями органов дыхания занимает лидирующую позицию [1]. Такую же картину отражают результаты исследований Центрального НИИ организации и информатизации здравоохранения Минздрава России, подтверждающие, что в период с 2000 по 2015 гг. аналогичные показате-

ли заболеваемости органов дыхания характерны и для Российской Федерации [2]. При этом заболеваемость по данному классу за 16-летний период составляла в среднем $318,33 \pm 17,74\%$, достигая максимального уровня в 2011 г. ($333,8\%$), а минимального — в 2004 г. ($293,4\%$) [2, 3]. В период с 2000 по 2015 гг. среднегодовая инцидентность пневмонией составила $4,21 \pm 0,63\%$, однако, по результатам эпидемиологических исследований многих специалистов (Чучалин А. Г. и др., 2009 г., 2014 г.; Жоголев С. Д., 2013 г., Бельских А. Н. и др., 2014 г.), заболеваемость внебольничной пневмонией (ВП) в РФ значительно выше и составляет ежегодно 5—20%, что в абсолютном значении приравнивается к 1,5 млн больных. На данный момент, инфекции нижних дыхательных

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 199178 Санкт-Петербург, В. О., средний пр. В. О., д. 57/43. Северо-западный институт управления РАНХ и ГС

путей занимают одно из лидирующих мест среди причин смертности населения не только в России, но и во всем мире [1, 2]. По данным НИИ пульмонологии ФМБА РФ, летальность от ВП, в период с 1999 по 2013 гг. возросла на 38%, составляя 38,5 тыс случаев в 2013 г. [3].

Высокая заболеваемость и летальность при ВП определяет значительность экономических затрат на лечение и реабилитацию. По данным фармакоэкономической оценки, ежегодно в РФ затрачивается 464,5 млн руб. на лечение ВП [1, 2]. В других странах данный показатель достигает аналогичного значения и даже превышает его. Так, например, в США ежегодные расходы на лечение при данной патологии достигают 8–10 млрд долларов, причём всего 14% данной суммы приходится на антибактериальные препараты, а в Великобритании данные расходы достигают 440 млн фунтов стерлингов, 96% из которых приходится на госпитализированных пациентов.

Проблема болезней органов дыхания (БОД) является одной из самых актуальных и для военной медицины [4, 5]. В период с 2004 по 2013 гг. $47,79 \pm 4,16\%$ обращений военнослужащих за медицинской помощью было зарегистрировано как относящихся к нозологическим единицам X класса МКБ-10 при максимальном количестве в 2013 г. (56,5%), а минимальном — в 2008 г. (42,2%) [4–7]. Динамика вклада нозологий X класса в структуру заболеваемости военнослужащих, по результатам нашего исследования, представлена на рис. 1. Причём, в Вооружённых Силах Российской Федерации (ВС РФ) основной вклад в показатели заболеваемости военнослужащих, проходящих военную службу по призыву, вносят группа 1 «Острые респираторные инфекции верхних дыхательных путей» (коды по МКБ-10 J00–J06) и группа 2 «Грипп и пневмония» (коды по МКБ-10 J10–J18).

Особо остро стоит вопрос заболеваемости ВП военнослужащих, проходящих военную службу по призыву, что определяет её военно-эпидемиологическое значение [4–6], которое заключается в существенной доле данной патологии в структуре заболеваемости военнослужащих по призыву и что более важно — вероятности тяжёлого и осложнённого течения, а также угрозы летального исхода. Следует отметить, что ВП характеризуется высоким уровнем трудопотерь, склонностью к эпидемическому распространению с охватом большого числа личного состава (прежде всего лиц из числа молодого пополнения) [7].

К началу третьего тысячелетия инцидентность ВП военнослужащих по призыву начала расти, достигнув в 2002 г. 45,5‰, а смертность составила 0,22‰. В период с 2002 по 2008 гг. отмечалось прогрессивное снижение уровня заболеваемости, который в 2008 г. достиг 28,2‰. За трехлетний период, с 2006 г. по 2008 г., не зарегистрировано летальных исходов от пневмонии [4, 7]. Однако в период с 2009 по 2011 гг. отмечен резкий рост заболеваемости ВП, который в 2010 г. достиг 69,6‰ [7]. Данный феномен связывают, с одной стороны, с пандемией высоковирулентного гриппа А (H1N1)-2009pdm, вирус которого способствовал снижению местного иммунитета трахеобронхиального дерева и выступал «проводником» для бактерий, а с другой — с сокращением срока службы до 1 года, в связи с чем повысилась численность призываемых контингентов в два раза и происходило обновление до половины личного состава с каждым приемом молодого пополнения [3, 7–9].

Специалистами Федерального государственного казённого учреждения (ФГКУ), филиала 1029, Центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора (ЦГСЭН), г. Владивосток и ФГКУ «1477 военно-морской клинический госпиталь», г. Владивосток, проведён ретроспектив-

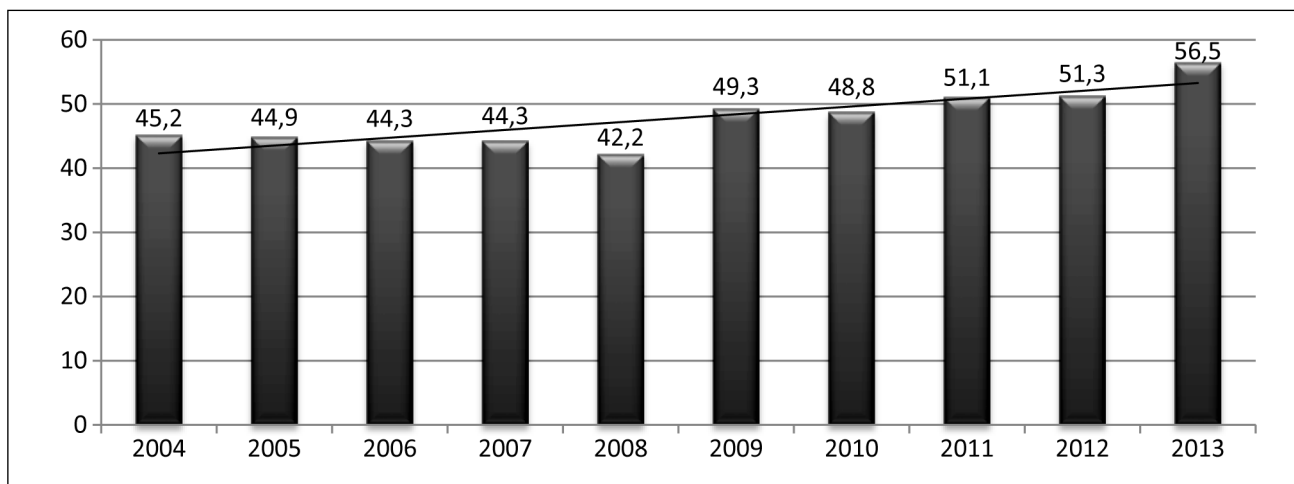


Рис. 1. Вклад БОД в общую заболеваемость среди военнослужащих (в %).

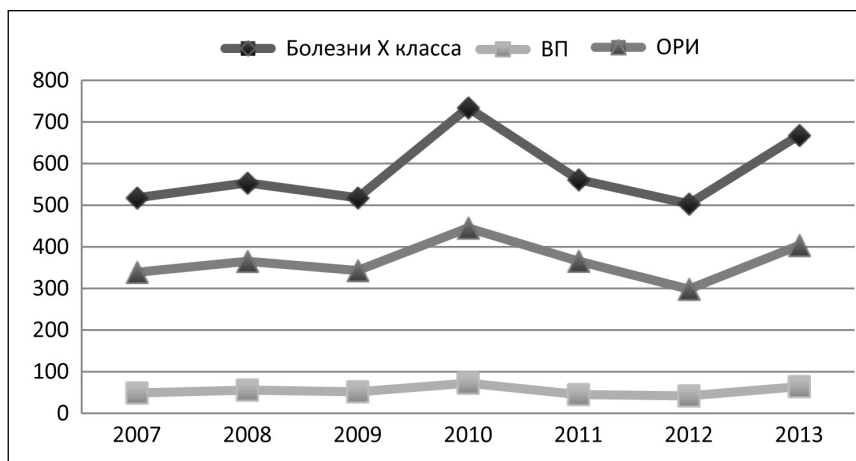


Рис. 2. Динамика уровня заболеваемости по X классу, ВП и ОРИ, %

ный анализ заболеваемости ВП военнослужащих Тихоокеанского Флота (ТОФ), проходящих военную службу по призыву, по данным медицинских отчетов о состоянии здоровья личного состава и деятельности медицинской службы (форма 3/МЕД) за период с 2007 по 2013 гг. По результатам исследования было установлено, что заболеваемость ВП военнослужащих, особенно проходящих службу по призыву, стремится к стабилизации на уровне от 48,8 ‰ (2007 год) до 72,55 ‰ (2010 г.) (таблица, рис. 2). По данным анализа ежемесячных медицинских отчетов, установлен подъем уровня заболеваемости БОД в период призывной компании с максимальным пиком заболеваемости в осенне-зимний период [6, 10–12].

Стоит отметить, что прививочная компания против гриппа и пневмококковой инфекции нашла свое отражение в динамике и структуре заболеваемости военнослужащих, проходящих военную службу по призыву.

В настоящее время иммунопрофилактика в РФ регламентирована Приказом Минздрава России от 21.03.2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям», согласно кото-

рому плановую вакцинацию против гриппа выполняют лицам, подлежащим призыву на военную службу [13]. Вакцинация в ВС РФ регламентирована указаниями заместителя Министра обороны от 30 сентября 2015 г. № 161/7/10015 «Об утверждении календарей профилактических прививок в Вооруженных Силах Российской Федерации», согласно которым профилактические прививки против гриппа по эпидемическим показаниям проводятся военнослужащим осеннего и весеннего призыва, не привитым перед призывом на военную службу, после про-

хождения углубленного медицинского обследования по прибытии в войсковую часть [14].

Применяемая для иммунопрофилактики отечественная вакцина «Гриппол плюс» содержит актуальные штаммы вирусов гриппа типов А и В, а также иммуностимулятор полиоксидоний. Такой состав вакцины позволяет создавать специфический иммунитет против вирусов гриппа, а также повышать неспецифическую резистентность организма за счет иммуностимулирующего действия полиоксидония, в частности — способности индуцировать Т-клеточный ответ, что в целом позволило снизить дозу антигена и, как следствие, реактогенность вакцины без потери её иммуногенности.

«Пневмо-23» — это 23-валентная пневмококковая полисахаридная вакцина. Она содержит капсульные полисахариды 23 серологических типов пневмококка, наиболее часто встречающихся в Российской Федерации и Европе. Препарат безопасен, слабо реактогенен, прошел все виды испытаний, в мае 1999 г. зарегистрирован в России и разрешен к применению на её территории, в том числе для иммунизации детей, начиная с 2-летнего возраста, и ослабленных лиц старше 65 лет. В списке показаний к иммунизации этой вакциной ука-

Динамика уровня заболеваемости по X классу у военнослужащих, проходящих военную службу по призыву, внебольничной пневмонией (ВП) и острыми респираторными инфекциями (ОРИ)

Год	Уровень заболеваемости военнослужащих, проходящих военную службу по призыву на ТОФ, %		
	Болезни X класса МКБ	ВП	ОРИ
2007	517,78	48,82	339,05
2008	553,66	55,92	365,15
2009	517,94	51,70	343,18
2010	734,22	72,55	445,27
2011	561,71	45,17	365,58
2012	503,49	41,96	298,44
2013	668,18	64,01	403,47
Среднее значение	579,57±87,81	54,30±10,82	365,73±47,73

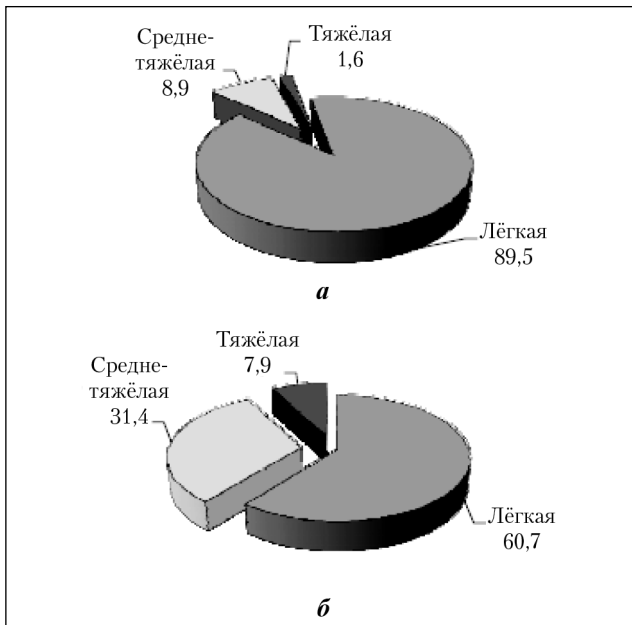


Рис. 3. Распределение ВП по степени тяжести у военнослужащих по призыву в 2001–2013 гг. (в %).

а – военнослужащие, вакцинированные «Пневмо-23»; б – невакцинированные военнослужащие.

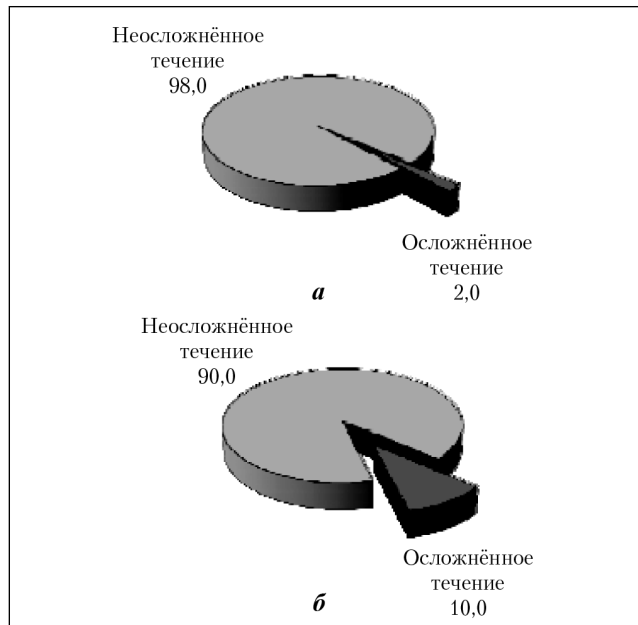


Рис. 4. Доля случаев осложнённого течения ВП у военнослужащих по призыву в 2001–2013 гг., в %.

а – военнослужащие, вакцинированные «Пневмо-23»; б – невакцинированные военнослужащие.

заны лица в организованных коллективах (детские сады, школы, студенческие коллективы, армия и т.д.), особенно перед поступлением в коллектив.

По данным ретроспективных многолетних исследований, в результате прививочной кампании произошло снижение уровня заболеваемости ВП по сравнению с 2000–2001 гг., при этом применение вакцин против гриппа и пневмококковой инфекции позволило снизить частоту развития случаев тяжёлого и осложнённого течения ВП, а также количество летальных исходов (рис. 3, 4) [6–8].

В настоящее время отсутствуют убедительные данные о снижении уровня заболеваемости ВП военнослужащих, проходящих военную службу по призыву, но также наблюдается тенденция к стабилизации инцидентности на одном, но достаточно высоком уровне [3].

В современной медицине рассматривается возможность применения в профилактических целях не только вакцин, но и методов, методик и лекарственных препаратов, влияющих на различные звенья эпидемического процесса. Для медицинской службы наиболее важным звеном является восприимчивый организм. Комплексные препараты, влияющие на звенья патогенеза инфекционных заболеваний, могут применяться для профилактики пневмонии. Примером такого препарата является Цитофлавин. Так, в многочисленных исследованиях [5, 11, 12, 15–21] показано, что применение данного комплексного препарата приводит к сохранению реологических свойств мокроты, поддержанию на должном уровне показателей местного им-

мунитета, оказанию анксиолитического эффекта, что в общей сумме способствует сокращению длительности лечения [11, 12]. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения цитофлавина как одного из компонентов комплексной профилактики и лечения ВП у военнослужащих, проходящих военную службу по призыву.

Выводы

1. Военно-эпидемиологическое значение внебольничной пневмонии заключается в широкой представленности данной патологии в общей структуре заболеваемости военнослужащих по призыву и, что более важно, в высокой вероятности её тяжёлого и осложнённого течения, а также угрозе летального исхода при данном заболевании. Следует отметить, что ВП характеризуется высоким уровнем трудопотерь, склонностью к эпидемическому распространению с охватом большого числа личного состава (прежде всего лиц молодого пополнения).

2. Применяемый в настоящее время комплекс профилактических мероприятий, включающий использование вакцин «Пневмо-23» и «Гриппол», позволил снизить частоту развития случаев тяжёлого и осложнённого течения ВП, а также количество летальных исходов. Однако отсутствуют убедительные данные о снижении уровня заболеваемости ВП у военнослужащих, проходящих военную службу по призыву, с сохранением высокого уровня инцидентности.

3. Проведённые исследования свидетельствуют о потенциальной возможности улучшения

эпидемиологической ситуации с внебольничной пневмонией у военнослужащих за счёт применения комбинированного препарата цитофлавин, приводящего к уменьшению количества и улучшению реологических свойств мокроты, поддержанию на должном уровне показателей местного

иммунитета, что способствует сокращению длительности лечения и повышению реабилитационного потенциала больного, в том числе и при внебольничной пневмонии в комплексе профилактических мероприятий у военнослужащих, проходящих военную службу по призыву.

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization et al. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. 2016.
- Российский статистический ежегодник. 2016: Стат.сб. Росстат. М.: 2016; 725. / Rossijskij statisticheskij ezhegodnik. 2016: Stat.sb. Rosstat. M.: 2016; 725. [in Russian]
- Материалы совещания у Председателя Правительства Российской Федерации Д.А. Медведева в режиме видеоконференции с субъектами Российской Федерации «О проблемах демографической политики» 10 июня 2015 г. / Materialy soveshhanija u Predsedatelja Pravitel'stva Rossijskoj Federacii D.A. Medvedeva v rezhime videokonferencii s sub#ektami Rossijskoj Federacii «O problemakh demograficheskoy politiki» 10 ijunja 2015 g. [in Russian]
- Жоголев С. Д., Огарков П. И., Жоголев П. Д. *соавт.* Эпидемиология и профилактика внебольничных пневмоний у военнослужащих. Воен-мед журн 2013; 11: 55—60. / Zhogolev S. D., Ogarkov P. I., Zhogolev P. D. *soavt.* Jepidemiologija i profilaktika vnebol'nicnykh pnevmonij u voennosluzhashchikh. Voен-med zhurn 2013; 11: 55—60. [in Russian]
- Борисов Д. Н. Структура и динамика заболеваемости военнослужащих Вооруженных Сил Российской Федерации в 2004—2013 гг. 2015; 16: 587—595. / Borisov D. N. Struktura i dinamika zabolevaemosti voennosluzhashchikh Vooruzhennykh Sil Rossijskoj Federacii v 2004—2013 gg. 2015; 16: 587—595. [in Russian]
- Шубин И. В. Опыт применения вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции в организованных коллективах военнослужащих. Вестник современной клинической медицины. — 2016. — Т. 9. — №. 6 — С. 103—108. / Shubin I. V. Opyt primeneniya vakcinoprofilaktiki pnevmokokkovoj infekcii v organizovannykh kolektivakh voennosluzhashchikh. Vestnik sovremennoj klinicheskoy mediciny. — 2016. — Т. 9. — №. 6 — С. 103—108. [in Russian]
- Овчинников Ю. В. Внебольничная пневмония у военнослужащих: тактика ведения и антимикробная терапия. Военно-медицинский журнал. 2016; 337: 3: 4—14. / Ovchinnikov Ju. V. Vnebol'nicnaja pnevmonija u voennosluzhashchikh: takтика vedenija i antimikrobnaja terapija. Voенno-medicinskij zhurnal. 2016; 337: 3: 4—14. [in Russian]
- Гусев Р. В. Оценка заболеваемости пневмониями в поствахтальном периоде у военнослужащих срочной службы / Р. В. Гусев, Ю. В. Орлов, Ю. Ш. Халимов, Е. В. Герашенко и др. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современные высокотехнологические методы лечения и реабилитации на всех этапах медицинской помощи»: матер. конф. Сестрорецк, 2014; 79. / Gusev R. V. Ocenka zabolevaemosti pnevmonijami v postvakcinal'nom periode u voennosluzhashchikh srochnoj sluzhby / R. V. Gusev, Ju. V. Orlov, Ju. Sh. Khalimov, E. V. Gerashhenko i dr. Vserossijskaja nauchno-prakticheskaja konferencija s mezhdunarodnym uchastiem «Sovremennye vysokotekhnologicheskie metody lechenija i reabilitacii na vseh etapakh medicinskoj pomoshhi»: mater. konf. Sestoreck, 2014; 79. [in Russian]
- Овчинников Ю. В., Азаров И. И., Кувшинов К. Э. и др. Организация мероприятий по профилактике и лечению заболеваний органов дыхания у военнослужащих. Воен-мед журн 2013; 334: 10: 21—44. / Ovchinnikov Ju. V., Azarov I. I., Kuvshinov K. E. i dr. Organizacija meroprijatij po profilaktike i lecheniju zabolevanij organov dykhanija u voennosluzhashchikh. Voен-med zhurn 2013; 334: 10: 21—44. [in Russian]
- Рыжман Н. Н., Бельских А. Н. Диагностика, лечение и профилактика внебольничных пневмоний тяжёлого течения у военнослужащих: Методические рекомендации. СПб: ВМедА. 2014; 60. / Rychman N. N., Bel'skikh A. N. Diagnostika, lechenie i profilaktika vnebol'nicnykh pnevmonij tjazhelogo techenija u voennosluzhashchikh: Metodicheskie rekomendacii. SPb: VMedA. 2014; 60. [in Russian]
- Никонова Е. М., Поляков А. А. Современная стратегия лечения инфекционных осложнений хронической обструктивной болезни лёгких. Перший Незалежний Науковий Вісник 2015; 2—1: 27—30. / Nikonova E. M., Poljakov A. A. Sovremennaja strategija lechenija infekcionnykh oslozhnenij khronicheskoy obstruktivnoj bolezni legkikh. Pershij Nezalezhnij Naukovij Visnik 2015; 2—1: 27—30. [in Russian]
- Шабанов П. Д., Мокренко Е. В. Синтетические индукторы интерферона в лечении и профилактике острых воспалительных заболеваний дыхательных путей. Поликлиника 2015; 3: 117—120. / Shabanov P. D., Mokrenko E. V. Sinteticheskie induktory interferona v lechenii i profilaktike ostrykh vospalitel'nykh zabolevanij dykhatel'nykh putej. Poliklinika 2015; 3: 117—120. [in Russian]
- Приказ Минздрава России от 21.03.2014 г. №125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показателям». / Prikaz Minzdrava Rossii ot 21.03.2014 g. №125n «Ob utverzhdenii nacional'nogo kalendarja profilakticheskikh privivok i kalendarja profilakticheskikh privivok po jepidemicheskim pokazanijam». [in Russian]
- Указания заместителя Министра обороны от 30 сентября 2015 года № 161/7/10015 «Об утверждении календарей профилактических прививок в Вооруженных Силах Российской Федерации». / Ukazanija zamestitelja Ministra oborony ot 30 sentjabrja 2015 goda № 161/7/10015 «Ob utverzhdenii kalendaraj profilakticheskikh privivok v Vooruzhennykh Silakh Rossijskoj Federacii». [in Russian]
- Ашоур А. З., Белов В. Г., Парфенов С. А., Ершов Е. В., Тучин И. А., Коваленко А. Л., Таликова Е. В. Эффективность сочетанного применения цитофлавина и когнитивной психотерапии в лечении генерализованного пародонтита у пациентов пожилого возраста. Стоматология 2016; 95: 2: 14—17. / Ashour A. Z., Belov V. G., Parfenov S. A., Ershov E. V., Tuchin I. A., Kovalenko A. L., Talikova E. V. Jefferktivnost' sochetannogo primeneniija citoflavina i kognitivnoj psikhoterapii v lechenii generalizovannogo parodontita u pacientov pozhilogo vozrasta. Stomatologija 2016; 95: 2: 14—17. [in Russian]
- Белов В. Г., Парфенов Ю. А., Оковитый С. В. Терапия синдрома алкогольной зависимости с использованием цитофлавина. Журн неврол психиатр им. С. С. Корсакова 2013; 113: 6—2: 54—57. / Belov V. G., Parfenov Ju. A., Okovityj S. V. Terapija sindroma alkohol'noj zavisimosti s ispol'zovaniem citoflavina. Zhurn nevrolog-psikhiatr im. S. S. Korsakova 2013; 113: 6—2: 54—57. [in Russian]
- Белов В. Г., Парфенов Ю. А., Василевская М. А., Парфенов С. А., Коваленко А. Л., Заплутанов В. А. Оценка влияния БОС-терапии и цитофлавина на динамику клинко-психофизиологического статуса у пожилых пациентов с остеохондрозом. Успехи геронтологии 2017; 30: 4: 601—608. / Belov V. G., Parfenov Ju. A., Vasilevskaja M. A., Parfenov S. A., Kovalenko A. L., Zaplutanov V. A. Ocenka vlijaniija BOS-terapii i citoflavina na dinamiku kliniko-psikhoфизиологического statusa u pozilykh pacientov s osteokhondrozom. Uspekhi gerontologii 2017; 30: 4: 601—608. [in Russian]
- Белов В. Г., Парфенов Ю. А., Нестеренко М. Ю., Володина К. И. Использование антиоксиданта/антигипоксанта в терапии астенического синдрома у пожилых пациентов. Успехи геронтологии 2013; 26: 2: 379—382. / Belov V. G., Parfenov Ju. A., Nesterenko M. Ju., Volodina K. I. Ispol'zovanie antioksidanta/antigipoksanta v terapii astenicheskogo sindroma u pozilykh pacientov. Uspekhi gerontologii 2013; 26: 2: 379—382. [in Russian]
- Заплутанов В. А., Белов В. Г., Парфенов Ю. А., Шахов Д. В. Цитофлавин в комплексной терапии больных пожилого возраста с синдромом алкогольной зависимости. Журн неврол психиатр им. С. С. Корсакова 2014; 114: 5—2: 73—78. / Zaplutanov V. A., Belov V. G., Parfenov Ju. A., Shakhov D. V. Citoflavin v kompleksnoj terapii bol'nykh pozhilogo vozrasta s sindromom alkohol'noj zavisimosti. Zhurn nevrolog-psikhiatr im. S. S. Korsakova 2014; 114: 5—2: 73—78. [in Russian]
- Захаров К. И., Парфенов С. А., Белов В. Г., Парфенов Ю. А., Ершов Е. В., Сапожников К. В., Коваленко А. Л., Харитонова Т. В., Скрипко В. Д. Бихевиоральная терапия и цитофлавин в лечении деформирующего коксартроза у пациентов пожилого и старческого возраста. / Zakharov K. I., Parfenov S. A., Belov V. G., Parfenov Ju. A., Ershov E. V., Sapozhnikov K. V., Kovalenko A. L., Kharitonova T. V., Skripko V. D. Bikhavioral'naja terapija i citoflavin v lechenii deformirujushhego koksartroza u pacientov pozhilogo i starcheskogo vozrasta. [in Russian]
- Парфенов С. А., Белов В. Г., Парфенов Ю. А. Динамика показателей функционального состояния центральной нервной системы у операторов военно-морского флота после длительного рабочего цикла на фоне приёма цитофлавина. Журн неврол психиатр им. С. С. Корсакова 2017; 117: 8: 55—58. / Parfenov S. A., Belov V. G., Parfenov Ju. A. Dinamika pokazatelej funkcional'nogo sostojaniija central'noj nervnoj sistemy u operatorov voenno-morskogo flota posle dlitel'nogo rabocheho cikla na fone priema citoflavina. Zhurn nevrolog-psikhiatr im. S. S. Korsakova 2017; 117: 8: 55—58. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Парфенов Сергей Александрович — к. м. н. преподаватель кафедры психологии управления и педагогики Северо-Западного института управления Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте Российской Федерации, Санкт-Петербург

Боровков Евгений Юрьевич — к. м. н. научный сотрудник Северо-Западного института управления Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте Российской Федерации, Санкт-Петербург

Шагвалиев Амирхан Гасанович — к. м. н. научный сотрудник Северо-Западного института управления Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте Российской Федерации, Санкт-Петербург

Тучин Илья Александрович — врач — специалист Войсковой части 3526 Федеральной службы войск национальной гвардии Российской Федерации

Белов Василий Георгиевич — д. м. н., профессор кафедры психологии управления и педагогики Северо-Западного института управления Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте Российской Федерации, Санкт-Петербург

Парфенов Юрий Александрович — д. м. н., профессор кафедры психологии управления и педагогики Северо-Западного института управления Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте Российской Федерации, Санкт-Петербург

Перспективные стратегии поиска новых средств борьбы с инфекционными заболеваниями

*Б. Г. АНДРЮКОВ, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ, Н. Н. БЕСЕДНОВА

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

Perspective Strategies for Finding New Means of Fighting with Infectious Diseases

*B. G. ANDRYUKOV, T. S. ZAPOROZHETS, N. N. BESEDNOVA

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

Возрастающая резистентность микроорганизмов к антибиотикам в последнее время перестаёт быть исключительно медицинской проблемой. Она затрагивает всё более широкий круг социально-экономических аспектов мирового сообщества и, достигнув высокого уровня, перерастает в глобальную угрозу здоровью населения планеты. В процессе эволюции бактерии выработали ряд эффективных стратегий защиты от антимикробных препаратов. Это обуславливает первостепенное значение разработки перспективных стратегий поиска альтернативных стратегий борьбы с инфекционными заболеваниями. В обзоре авторы обсуждают и анализируют несколько направлений поиска новых средств, потенциально способных стать альтернативой традиционной антибиотикотерапии.

Ключевые слова: антибиотики, антибиотикорезистентность, фаготерапия, антимикробные пептиды (AMP), бактериоцины, вакцины, моноклональные антитела.

Increasing resistance of microorganisms to antibiotics has recently ceased to be an exclusively medical problem. It affects an ever wider range of socio-economic aspects of the world community and, having reached a high level, grows into a global threat to the health of the world's population. In the course of evolution, bacteria have developed a number of effective strategies for protection against antimicrobial agents. This causes the paramount importance of developing promising strategies for finding alternative strategies for combating infectious diseases. In this review, the authors discuss and analyze several areas of searching for new drugs, potentially capable of becoming an alternative to traditional antibiotic therapy.

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance, phagotherapy, antimicrobial peptides (AMP), bacteriocins, vaccines, antimicrobial substances, monoclonal antibodies.

Введение

Бесконтрольное и необоснованное применение антибактериальных средств в лечебных и профилактических целях в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, а также в пищевой промышленности привело к постепенному формированию устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, которая сегодня является общемировой проблемой. По мнению экспертов ВОЗ, к середине XXI века в результате сложных и многофакторных причин устойчивость к антибиотикам достигнет такого уровня, который будет представлять глобальную угрозу здоровью населения [1, 2].

Проблема бактериальной устойчивости перестаёт быть исключительно медицинской, затрагивая все более широкий круг социально-экономических аспектов мирового сообщества. Известно, что пациенты, инфицированные резистентными бактериями, нуждаются в более длитель-

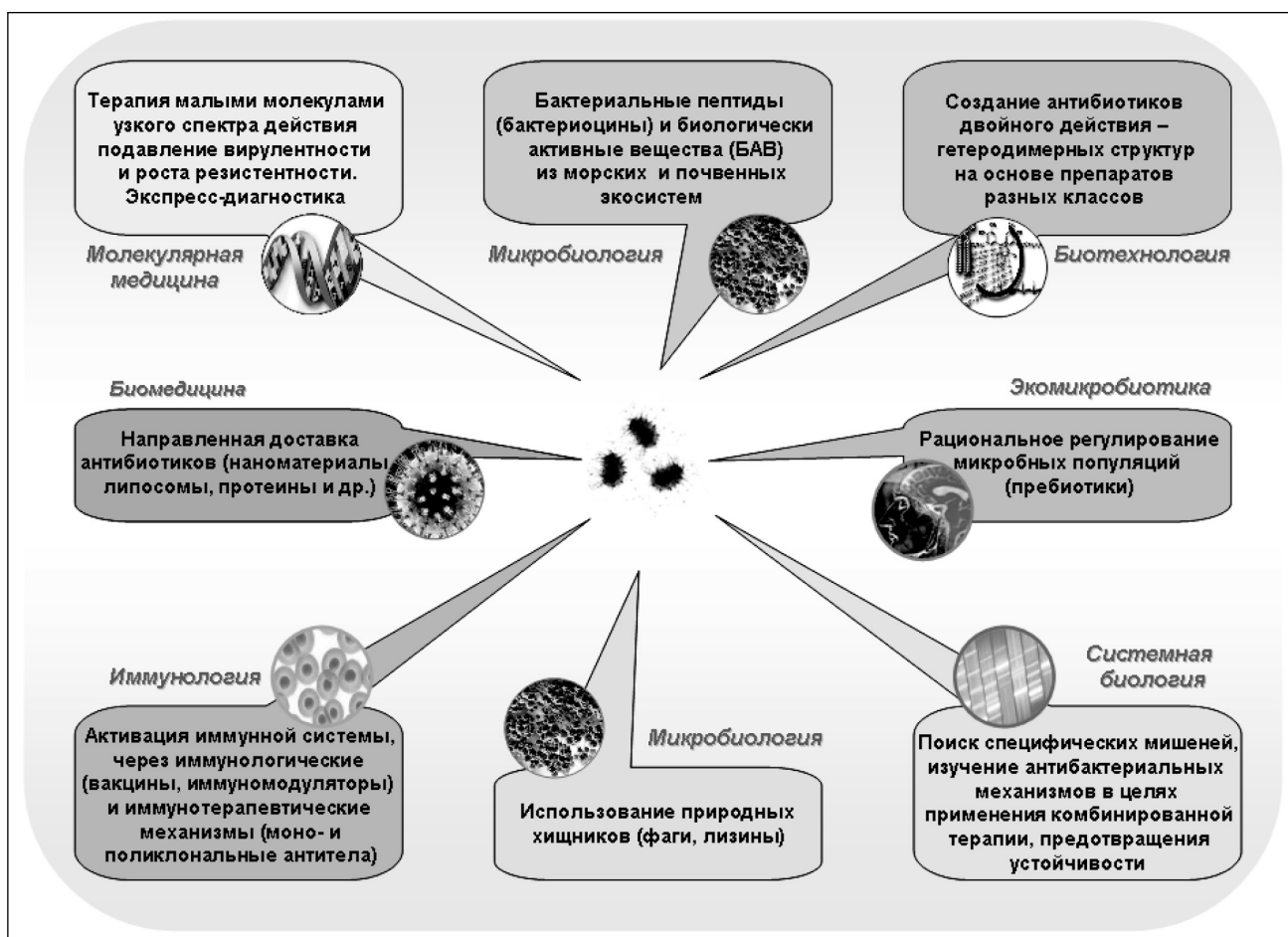
ном лечении и подвергаются повышенному риску смертности.

Прогнозируется, что из-за отсутствия адекватной терапии к 2050 г. в мире десятки миллионов жизней в год будут подвергаться риску гибели от бактериальных инфекций, а экономические потери государств из-за роста лекарственно-устойчивых инфекций составят сотни триллионов долларов [3, 4].

Процесс формирования устойчивости бактерий к лекарственным средствам идёт невероятно быстро. Так, например, обнаружено, что некоторые бактерии, такие как *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, которые еще несколько лет назад были восприимчивы к традиционным антибиотикам, начали приобретать устойчивость к цефалоспорином третьего поколения [5]. Лекарственно-устойчивый туберкулёз вошёл в число биологических агентов, которые позиционируются в настоящее время в качестве потенциального биологического оружия массового поражения. Ситуация усугубляется появлением в 2006 г. практически неизлечимой формы заболевания, вызываемой микобакте-

© Коллектив авторов, 2018

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



Современные инновационные антибактериальные направления — потенциальные альтернативы традиционной антибиотикотерапии

риями туберкулёза с широкой лекарственной устойчивостью не только к рифампицину и изониазиду, но и к бактерицидным препаратам второго ряда — канамицину и офлоксацину [6].

В процессе жизнедеятельности бактерии выработали ряд эффективных стратегий защиты от антибактериальных препаратов:

- защита от внутриклеточного проникновения антибиотика [7, 8];
- производство гидролитических ферментов (например, β -лактамаз, карбапенемаз), которые вызывают разрушение антибиотиков [7, 9];
- модификация рецепторов-мишеней противомикробных средств [10, 11];
- снижение концентрации антибиотика во внутриклеточной среде с помощью насосов, присутствующих в бактериальных мембранах [11, 12];
- модификация ферментативного пути, приводящая к уменьшению бактериальной восприимчивости к антибиотикам [12, 13];
- потеря внутриклеточных ферментов, используемых для активации антибактериальных средств [14, 15].

В этих условиях необходимость разработки потенциально новых средств борьбы с лекар-

венно-устойчивыми микробными штаммами имеет первостепенное значение [16].

Среди современных инновационных антибактериальных направлений — потенциальных альтернатив традиционной антибиотикотерапии — бактериофаги и фаготерапия, использование моноклональных антител, вакцин, биологически активных веществ, антимикробных пептидов, бактериоцинов, амфифильных полипептидов, которые вызывают нарушение бактериальной мембраны, и могут быть использованы для лечения бактериальных, грибковых и вирусных инфекций, а также другие альтернативные стратегии (рисунок).

Цель обзора — анализ и обсуждение современных инновационных антимикробных практик, которые являются потенциальными альтернативами традиционной антибиотикотерапии.

Бактериофаги и фаготерапия. В последние годы наблюдается возрастание интереса к бактериофагам и использованию их с лечебными целями, особенно для терапии инфекций, ассоциированных с антибиотикорезистентными штаммами бактерий.

Фаги до появления антибиотиков достаточно широко применялись для лечения инфицирован-

ных ран и ряда кишечных инфекций, после чего интерес к ним заметно упал, особенно в связи с сообщениями о появлении фагоустойчивых бактерий и недостаточными знаниями о патогенетических основах фаготерапии [17, 18]. Однако значительный рост устойчивости многих видов бактерий к антибиотикам вновь заставил учёных вспомнить о фаготерапии, но уже с новых позиций.

В 70—80-е годы прошлого века появились сообщения о случаях успешного применения фаготерапии при эпидемических вспышках холеры (Пакистан) и диареи у домашних животных в странах Западной Европы [19, 20]. Эти работы положили начало возрождению интереса учёных разных стран к фаготерапии. Этому в немалой степени способствовал накопленный опыт отечественных и польских учёных, которые не прекращали исследования по проблеме фаготерапии. Они внесли решающий вклад в изучение строения, антимикробного действия фагов и реакций на них со стороны иммунной системы человека [21—23]. К настоящему времени охарактеризовано около 5000 бактериофагов.

Фаговая терапия безопасна для организма и свободна от неблагоприятных побочных эффектов, что связано с отсутствием у этих биологических объектов какого-либо метаболического механизма, т.к. фаги являются облигатными внутриклеточными паразитами бактерий, использующими генетический и биохимический механизмы бактерий-хозяев [24, 25].

Процесс инфицирования бактерий фагами достаточно подробно описан в ряде работ [26, 27].

Для терапии бактериальных инфекций особый интерес представляют умеренные лизогенные фаги [27, 28]. При этой разновидности фаготерапии применяются генетически модифицированные лизины для встраивания в геном бактериальной клетки посредством лизогенизации специфических генов, увеличивая её восприимчивость к определённому классу антибиотиков [24, 29].

Лизины представляют собой ферменты (в зависимости от типа каталитического домена — мурамидазы, глюкозамидазы, трансгликолидазы, эндопептидазы или амидазы), продуцируемые и накапливаемые бактериофагами в бактериальной цитоплазме на конечном этапе фаголитического цикла. Таким образом, высвобождается профаг и обеспечиваются новые циклы инфицирования бактерий. Лизины были широко протестированы и применены на различных моделях животных для контроля и лечения бактериальных инфекций, устойчивых к терапии обычными химическими антибиотиками [27, 30]. Эти агенты показали высокую надёжность, специфичность и быструю способность стимулировать лизис клеток в целевых бактериях в нанограммовых концентрациях, значительно уменьшая количество микро-

организмов, через несколько секунд после добавления литического фермента [29, 31]. Другие исследования показали синергизм действия лизинов и β -лактамного антибиотика против штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых к метициллину [29, 32]. Лизиновая терапия в настоящее время признана инновационным антимикробным средством лечения инфекций, вызванных грамположительной флорой. Местное введение препаратов, содержащих несколько нанограммов очищенных рекомбинантных лизинов, вызывает немедленный лизис бактериальных клеток. Кроме того, эта терапия демонстрирует синергетический потенциал в сочетании с некоторыми химическими антибиотиками [25, 33].

Однако у фаготерапии есть свои недостатки и условия использования, несоблюдение которых снижает её эффективность. Это, прежде всего, индукция образования специфических (нейтрализующих) антител против фагов, снижающая эффективность терапии [31, 34]. Кроме того, бактерии вырабатывают ряд механизмов устойчивости к бактериофагам. Защитные стратегии включают в себя нарушение процесса адсорбции фагов к поверхности бактерий. Мутации приводят к потере специфических поверхностных рецепторов бактериальных клеток, которые позволяют связывать бактерии с фагом. Бактерии могут также индуцировать образование на поверхности клеток слизистой оболочки, затрудняющей связывание фага с рецептором [23, 35].

В дополнение к этим механизмам бактерии могут гидролизовать генетический материал фага рестрикционными эндонуклеазами, присутствующими в их цитоплазме, а также способны метилировать свою собственную ДНК, защищая её от фагов. Кроме того, резистентность бактерий также может быть вызвана мутациями в генах, кодирующих белки, которые необходимы для репликации фага или для сборки новых частиц вирионов [23, 36, 37].

Интересны сообщения о результатах современных фаговых технологий борьбы с бактериальной контаминацией в процессе производства молочных продуктов [24, 38], ветеринарии [18, 37—39], а также в системах очистки сточной и питьевой воды [35, 40—43].

Таким образом, в настоящее время перспективы фаготерапии достаточно оптимистичны, а результаты модельных исследований и клинических испытаний позволяют надеяться на то, что устойчивый рост научного интереса к фагам приведёт к их широкому клиническому использованию.

Бактериоцины. В процессе жизнедеятельности для защиты и конкурентной борьбы за пространство и питательные вещества с другими таксономически родственными бактериями одного и того же вида или рода микроорганизмы синтези-

руют специфические пептиды с антимикробной активностью (AMP). Эти вещества получили название бактериоцинов [8, 44, 45].

Первый бактериоцин выделил А. Gratia в 1925 г. из вирулентного штамма *Escherichia coli* [46, 47]. Новое вещество, получившее название колицин V, обладало ингибирующей активностью в отношении других штаммов кишечной палочки [48]. В дальнейшем бактериоцины разных типов, структур и механизмов действия были выделены и из других микроорганизмов [8, 49–51].

В настоящее время охарактеризованы сотни бактериоцинов, продуцируемых многими бактериями. Все они собраны в доступные базы данных и в последние десятилетия используются как в пищевой (для консервации готовых продуктов), так и в фармацевтической промышленности (для разработки антибактериальных препаратов).

Среди наиболее известных и изученных бактериоцинов, активных в отношении грамотрицательной микрофлоры, являются колицины и микроцины (полученные из *E.coli*). Они ингибируют рост представителей семейства *Enterobacteriaceae* — *Aeromonas* sp., *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Yersinia* sp. и *Pseudomonas* sp. Однако они оказались неактивными в отношении грамположительной флоры. С другой стороны, грамположительные бактерии синтезируют бактериоцины, например, субтилин и низин А, неактивные в отношении грамотрицательных бактерий, имеющих трёхслойную клеточную мембрану [46, 49, 52].

В зависимости от химической структуры, молекулярной массы, механизма действия и рецепторных мишеней все изученные бактериоцины систематизированы. В соответствии с предложенными классификациями они подразделяются на классы, группы и типы [46, 52, 53]. Одна из последних классификаций предложена Р. Alvarez-Sieiro et al. (2016), который на основании механизмов биосинтеза и биологических свойств выделяет три класса бактериоцинов [50].

Все известные бактериоцины характеризуются структурным разнообразием. Однако в типичном виде большинство из них состоит из С-концевого домена, ответственного за образование пор в мембране бактериальных клеток, и N-терминального домена, который связывает бактериоцины с клеточным рецептором, присутствующим на поверхности бактерий.

Внутри бактериальной клетки-продуцента бактериоцины находятся в неактивном состоянии, благодаря присутствию на N-терминальном домене ведущего пептида. Их активация происходит путем расщепления ведущего пептида протеазами после секреции во внеклеточную среду с помощью специфических белков-транспортёров [52, 54].

Механизмы антибактериального действия бактериоцинов также разнообразны. Кроме того,

во многих случаях один тип этих пептидов может проявлять несколько тактических вариантов атак на бактерии-мишени. Это может быть повышение проницаемости клеточной мембраны путём нейтрализации анионного заряда фосфолипидного бислоя с его последующим разрушением (низин А), ингибирование синтеза пептидогликана и образование пор в мембране бактериальных клеток (лактицин 3147), истощение протон-двигательной силы клеточной мембраны и АТФ с последующей гибелью клеток (педиоцин РА-1/АсН), увеличение проницаемости клеточной мембраны и истощение катионов, необходимых для жизнеспособности клеток, таких как кальций, магний и фосфаты (лактококцины G и Q) и другие [8, 49, 55].

Однако в научной литературе уже появились многочисленные сообщения о том, что бактерии выработали ряд защитных стратегий против бактериоцинов и приобрели устойчивость к ним. Эти механизмы устойчивости, по-видимому, связаны с мутациями в бактериальной ДНК [51, 56].

К настоящему времени накоплен большой опыт применения бактериоцинов в пищевой промышленности, медицине и ветеринарии. Наиболее используемыми в пищевой индустрии в качестве биопрепаратов являются лантибиотики, получившие в Американском управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) и Европейском агентстве по лекарственным средствам (EMA) статус GRAS (безопасные). Одними из наиболее изученных и широко используемых являются лантибиотики, синтезируемые молочнокислыми бактериями. Эти бактериоцины имеют катионную и амфифильную структуру и низкую молекулярную массу (3–10 кДа). В зависимости от количества аминокислотных остатков они подразделяются на I и II классы [8, 51, 57].

Как облигатные бактерии желудочно-кишечного тракта, они легко метаболизируются до аминокислот пищеварительными протеазами.

Лантибиотики не имеют вкуса и запаха, демонстрируют высокую стабильность и высокую специфичность для конкретных бактерий [8, 51, 53]. Некоторые виды лантибиотиков обладают свойствами, которые позволяют применять их для лечения инфекций желудочно-кишечного тракта, вызванных *Helicobacter pylori*, *E.coli* и *Salmonella* [4, 51, 58].

Бактериоцины низин А и педиоцин РА-1 уже более 10 лет используются в качестве консервантов в пищевой индустрии, благодаря своим свойствам ингибировать рост таких бактерий, как *C.botulinum*, *E.faecalis*, *L.monocytogenes*, *S.aureus* и другие [41, 52, 54]. Другой бактериоцин, энтероцин RM6, был выделен из *E.faecalis*, присутствующих в сыром молоке. Он оказался активным про-

тив грамположительных бактерий, включая *L.monocytogenes*, *B.cereus* и метициллинорезистентные штаммы *S.aureus*, ингибируя размножение этих патогенных бактерий в пищевых продуктах [4, 59, 60].

Высокая специфичность антибактериальных свойств и безопасность лантибиотиков для организма обусловили широкое использование некоторых из них (низин А и F, мерсацидин, мутацин 1140, лактацин 3147 и педиоцин АсН / РА-1) в качестве лечебных и профилактических биопрепаратов. Применение этих бактериоцинов для лечения бактериальных инфекций, ассоциированных с метициллино- и ванкомицинорезистентными штаммами патогенных бактерий, хорошо зарекомендовало себя как потенциальная терапевтическая стратегия борьбы с множественной лекарственной устойчивостью [61–63].

Например, результаты экспериментальных исследований [45] показали, что низин F (выпускается в настоящее время под торговыми марками Nisaplin в США и Nisin Vega в Китае) ингибировал рост *S.aureus* у инфицированных мышей в течение 15 мин после введения, а клинические испытания низина А [57, 59, 64] при лечении мастита у восьми женщин показали значительное снижение количества *S.aureus* в грудном молоке и полное выздоровление пациенток спустя 14 дней. Кроме того, низин был одобрен в 1969 г. комиссией ВОЗ и в настоящее время лицензирован более чем в 50 странах как безопасная пищевая добавка [16].

Бактериоцин лактоспорулин (IM-9), продуцируемый *Brevibacillus* sp., с молекулярной массой 5,6 кДа оказался устойчивым к высоким температурам (до 120°C), толерантным к изменениям pH (между 2 и 10) и действию протеаз. При этом изменения этих параметров окружающей среды не влияли на его широкую антибактериальную активность как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, таких как *B.subtilis*, *S.aureus*, *E.coli*, *L.monocytogenes* и *P.aeruginosa*. Можно считать, что лактоспорулин является инновационным бактериоцином широкого спектра действия с потенциальными возможностями для лечения нескольких бактериальных инфекций [64].

Таким образом, бактериоцины являются перспективной альтернативой антибиотикам, а их практическое использование в медицине, ветеринарии и пищевой индустрии может рассматриваться как инновационная стратегия в профилактике и борьбе с бактериальными инфекциями. Однако, несмотря на многолетний успешный опыт применения, их промышленное производство недостаточно финансируется по ряду причин, связанных с низким выходом и нестабильностью свойств готовых препаратов, дорогостоящей и трудоемкой очисткой.

Решение этих проблем видится в использовании методов геной инженерии и генетическом

конструировании бактериоцинов. Это сможет повысить их антибактериальную активность и спектр действия, стабильность свойств и условий применения [61, 63]. Кроме того, в настоящее время исследователи пытаются разработать химерные бактерии, заменяя N-концевой домен определённого класса бактериоцинов с C-терминальным доменом другого класса. По их мнению, это может повлечь за собой образование более мощных и активных бактериоцинов. Например, генетическая модификация педиоцина РА-1 привела к получению нескольких химерных педиоцинов, которые имели равную или большую антимикробную активность [63, 64].

В последние годы внимание исследователей всё больше привлекают морские бактерии родов *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas*, *Alteromonas* и др. в качестве неисчерпаемого источника новых бактериоцинов в связи с высоким биологическим разнообразием этой экосистемы и тем, что она ещё не до конца изучена. Вполне возможно, что в ближайшем будущем именно у морских микроорганизмов будут обнаружены перспективные бактериоцины с более широким спектром антибактериальной активности. Они увеличат арсенал средств борьбы против мультирезистентных бактерий и, несомненно, повысят привлекательность бактериоцинов в качестве новой стратегии и возможной альтернативы антибиотикам [56, 63].

Антимикробные пептиды (АМР). В качестве антимикробных агентов предлагается также группа эндогенных пептидов [5, 65]. В настоящее время известно более 1700 АМР [58, 66] и некоторые из них хорошо изучены и охарактеризованы.

В зависимости от аминокислотного состава и вторичной структуры АМР подразделяются на четыре группы, отличающиеся по размерам и механизмам действия:

- пептиды с α -спиральной структурой;
- пептиды с β -многожильной структурой;
- линейные пептиды с неупорядоченной структурой;
- пептиды с петлевой структурой [67, 68].

В катионной (чаще) структуре АМР представляет интерес амфипатическая область, состоящая из гидрофобных и гидрофильных доменов и являющаяся ключевой для их механизма действия. Она участвует в образовании пор, последующем клеточном лизисе и разрушении мембраны бактериальных клеток. АМР имеют широкий спектр и высокую скорость антимикробного действия в защитной стратегии животных и растений против нескольких типов бактерий, грибов и вирусов [69, 70].

Важно отметить, что не все АМР действуют путем лизиса клеточной мембраны. Некоторые из них способствуют гибели клеток бактерий, накапливаясь внутриклеточно. Такие пептиды могут влиять на жизненно важные процессы жизнедеятельности клеток:

- активировать репликацию ДНК или синтез мРНК;

- вызывать перегруппировку и конформацию внутриклеточных белков;

- снижать активность цитоплазматических ферментов;

- вызывать перекисное окисление липидов с последующим образованием свободных радикалов кислорода, повреждением ДНК, деполяризацией мембран митохондрий, апоптозом и в конечном итоге гибелью бактериальных клеток. [71]. По-видимому, в контексте бактериальной инфекции, АМР используют одновременно несколько механизмов действия [71, 72].

Кроме антимикробной активности в отношении бактерий с множественной лекарственной устойчивостью и антибиоплёночного действия, АМР обладают способностью быстро стимулировать накопление нейтрофилов и макрофагов в очаге инфекции, нейтрализовать эндотоксины грамотрицательных бактерий, ускорять грануляционные процессы в ране, стимулировать ангиогенез, оказывать противовоспалительное действие [68, 71, 73].

К недостаткам АМР следует отнести гемолитический эффект, присущий большинству представителей этого класса соединений, восприимчивость к действию протеаз, дестабилизирующее действие на мембраны клеток при введении в больших дозах, сравнительно высокие затраты на производство и очистку, недостаточную изученность фармакокинетики и фармакодинамики, теоретическую возможность развития микробной резистентности к АМР [47, 48, 52]. Однако некоторые АМР лишены вышеперечисленных недостатков, что делает возможным использование их в качестве новых антимикробных агентов [72–74].

Несмотря на массу положительных качеств, практическое использование АМР до настоящего времени ограничено. Это связано с тем, что в клинических испытаниях высокие концентрации, демонстрирующие терапевтический антимикробный эффект пептидов *in situ*, оказались очень близки к токсическим дозам. Кроме того, выяснилось, что из-за небольшого размера АМР они фильтруются в почках, что резко сокращает период их полураспада [73].

В настоящее время несколько новых АМР находятся на разных этапах доклинических и клинических испытаний, демонстрируя различную терапевтическую активность. Омиганан (МВ1-226, синтетический аналог индолидидина) с расширенным спектром активности против микроорганизмов, в том числе грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов (*Candida* sp.); ХОМА 629 и Мигених МХ-226, активные против *Propionibacterium acnes*, используются для ле-

чения угревой сыпи (акне); Iseganan (IB-367), синтетический катионный АМР с широким спектром активности против бактерий и грибов, применяется для лечения респираторных инфекций, кистозного фиброза и язв в полости рта; катионный пептид Р113, с высокой терапевтической активностью *in vitro* против *Candida albicans*, с потенциалом, который может рассматриваться в качестве альтернативного препарата для лечения кандидоза полости рта у людей, инфицированных ВИЧ; пептид ДРК-600, который находится в клинических испытаниях для лечения атопического дерматита; плектазин, первый АМР, полученный из гриба *Pseudoplectania nigrella* [74, 75].

Ряд пептидов уже более 10 лет достаточно активно используются в клинической практике и признаны в качестве антибактериальных и антифунгицидных средств. На фармацевтическом рынке на сегодняшний день АМР представлены в виде группы новых антибиотиков. Наиболее широкую известность получили полимиксины В и Е (колистин) и даптомицин (инъекционный вариант — Cubicin®). Даптомицин представляет собой продуцируемый *Streptomyces roseosporus* циклический анионный липопептид, который демонстрирует бактерицидную активность в отношении чувствительных грамположительных микроорганизмов (стафилококков — *S.aureus*, *S.haemolyticus*, стрептококков — *S.agalactiae*, *S.pyogenes*, группы G, *Cl.perfringens*, *Peptostreptococcus* spp.). Он используется для лечения инфекций, вызванных, в том числе резистентными к метициллину, ванкомицину и линезолиду штаммами [71, 76].

Несомненный интерес представляет сравнительно недавно открытый α -спиральный пептид Нр1090 из яда скорпиона *Heterometrus petersii*, показавший на доклинических испытаниях активность против вируса гепатита С (HCV). Механизм антивирусного действия связан с ингибированием репликации РНК HCV и тем самым предотвращением инфекции. Таким образом, Нр1090 можно рассматривать в качестве перспективного потенциального агента для терапевтической стратегии против хронического вирусного гепатита С, ассоциированного с циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой [77, 78].

Наконец, среди перспективных АМР следует упомянуть пептид Кн2-7, выделенный из яда скорпиона *Mesobuthus martensii*. В испытаниях на мышинных моделях этот пептид показал широкую антибактериальную (*S.aureus*, *B.subtilis*, *B.thuringiensis* и *M.luteus*, *E.coli* и *P.aeruginosa* и мультирезистентные штаммы) [72, 79] и антивирусную активность (выявил наибольшую тропность к вирусу ВИЧ-1, эффективно ингибируя его репликацию). Кроме того, есть несколько интересных результатов научных исследований, демонстрирующих *in vitro* наличие у этих пептидов

противоопухолевой активности в опухолевых клетках мочевого пузыря, молочной железы, моноцитарного лейкоза (сестропин В, LL-37, MDA MB 435) [71, 79], способность ингибировать образование биоплёнок [72, 80].

Важно отметить и установленный эффект синергетического взаимодействия пептидов с традиционными антибиотиками. Этот эффект связан с тем, что АМР нарушают структуру мембраны бактериальных клеток, что увеличивает их проницаемость для антибиотиков и способствует их проникновению и интрацеллюлярному накоплению. Например, введение пептидов магаинина II (выделенного из лягушки *Xenopus laevis*) и кекропина А (изолированного из гемолимфы *Hyalophora cecropia*) совместно с рифампицином, выявило существенное снижение количества *Pseudomonas aeruginosa* не только *in vitro*, но и в клинических испытаниях *in vivo* [74, 77, 80].

Многочисленные положительные эффекты АМР позволяют рассматривать их в качестве потенциальной и инновационной альтернативной стратегии существующей традиционной антибиотикотерапии. Они могут использоваться при микробных и вирусных инфекциях одновременно с несколькими обычными антибиотиками и противовирусными препаратами, проявляя синергические эффекты. Кроме того, пептиды могут применяться как иммуномодуляторы, а также в качестве нейтритизаторов бактериальных эндотоксинов, предотвращая, например, септический шок [75, 78, 81].

В настоящее время для преодоления недостатков использования АМР в качестве возможной альтернативной стратегии традиционной антибиотикотерапии предлагается несколько решений, в том числе: введение новых аминокислот в концевую область АМР с целью повышения стабильности пептидов действию протеаз; инкапсуляцию пептидов в липосомах для накопления их *in situ* и уменьшения их токсичности; синтез разветвленных АМП (дендримеров); синтез с помощью генной инженерии недорогих пептидов активных против мультирезистентных бактерий и грибов; синтез АМП, иммобилизованных на различных полимерных матрицах [51]. Таким образом, АМП остаются в центре внимания многочисленных исследовательских групп в мире, проявляющих интерес как к научным, так и к практическим аспектам их действия и применения в качестве новых антибиотиков.

Антибактериальные антитела. Серьёзные исследования механизмов действия и фармакокинетики моноклональных антибактериальных антител стали проводиться в последние десятилетия. Однако лечение бактериальных инфекций с их помощью пока ещё не стало реальностью, так как большинство таких препаратов всё ещё находится на разных стадиях клинических испытаний. Для

производства их используют метод гибридом.

Механизмы действия антител разнообразны и зависят от целевой бактерии и мишени. Например, рекомбинантные антитела pagibaximab (BSYX-A110) при трёхкратном системном введении оказывали специфическое действие на липотейхоевые кислоты *Staphylococcus aureus*, необходимые для стимулирования экспрессии TLR2. При связывании с липотейхоевыми кислотами антитела этого типа стимулировали фагоцитоз и ингибировали выделение провоспалительных цитокинов. Таким образом, антитела BSYX-A110 зарекомендовали себя хорошо переносимыми, безопасными и эффективными при лечении и профилактике инфекций, вызванных *Staphylococcus aureus* [4, 82–84].

Иные механизмы повреждающего действия у антител 2E9IgA1, специфичных для *Mycobacterium tuberculosis*. Они обладают высокой тропностью для α -кристаллического рецептора микобактерии, а также для рецептора CD89 макрофагов и нейтрофилов, что обуславливает либо стимуляцию фагоцитоза бактерий, либо активацию бактерицидного действия нейтрофилов. Применение этих антител может в ближайшем будущем способствовать сокращению времени химиотерапии у пациентов с туберкулёзом, снижать вирулентность микобактерий и предотвращать появление штаммов с множественной лекарственной устойчивостью [82].

Накопленный опыт использования моноклональных антител в клинической практике показал их высокую активность в борьбе против бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. Чрезвычайная избирательность в сочетании с безопасностью и эффективностью делает их перспективными терапевтическими стратегиями.

Однако использование антител имеет и некоторые недостатки, связанные с дорогостоящими технологиями их получения и очистки, что с учётом небольшого спроса отражается на стоимости конечного продукта. Кроме того, необходимость системного использования антител и потеря со временем клинической эффективности из-за антигенной вариации бактерий ограничивают их практическое применение [83, 84].

Вакцины. Современные вакцины представляют собой рекомбинантные антигены, которые при введении в организм с помощью адъюванта или плазмиды индуцируют иммунный ответ против конкретного возбудителя. Кроме того, антимикробные вакцины могут содержать живые рекомбинантные микроорганизмы, такие как *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* spp. и *Shigellae* spp., в геном которого был вставлен ген, кодирующий желаемый антиген(ы). Такого рода ДНК-вакцины уже нашли практическое применение. При конструировании

нии таких вакцин гены вводятся в плазмиду и кодируют несколько антигенов. Таким образом, при введении они могут индуцировать выработку специфических антител против нескольких возбудителей [4, 85, 86].

Среди перспективных препаратов, находящихся в настоящее время на клиническом испытании, следует выделить вакцину IC43, состоящую из двух рекомбинантных антигенов и предназначенную для профилактического применения против инфекций, ассоциированных с *Pseudomonas aeruginosa*; вакцины GSK2392105A и SA3Ag, содержащие по 3–4 антигена, которые иммунизируют против *Staphylococcus aureus*; вакцины, защищающие от *Neisseria meningitidis*, *Burkholderia pseudomallei* и *Escherichia coli*; а также препарат H1aH35L, содержащий генетически инактивированный α -токсин и вызывающий иммунизацию мышей при инфицировании *Staphylococcus aureus* [85, 87].

В странах, регулярно проводящих антипневмококковую вакцинацию, например, в Великобритании, наблюдалось снижение случаев инфекций верхних дыхательных путей, ассоциированной с этим возбудителем (отиты, фарингиты и синуситы) на 20% [85].

Иные источники потенциальных новых антимикробных агентов. Необходимость поиска новых антибиотиков с иными механизмами антибактериального действия привела к чрезвычайно интересной идее — вернуться к изучению натуральных продуктов путём скрининга почвенных микроорганизмов, но на этот раз с использованием новых современных технологий. Поиск и открытие источников новых антимикробных соединений из почвенных микроорганизмов активно проводился в 60–70-е гг. прошлого столетия, однако он довольно быстро завершился в связи с трудностями с их лабораторным культивированием и идентификацией. Около 99% этих бактерий не культивировались в лабораторных условиях [86]. К идее выращивать, дифференцировать и изучать антимикробную активность микроорганизмов из почвы вернулись в последние годы, когда Nikols et al. (2010) разработала для этих целей многоканальную систему, состоящую из сотен наноразмерных диффузионных камер под названием iChip. Эта система позволяет одновременно изолировать и выращивать некультивируемые бактерии [87].

Новый подход вскоре начал давать свои результаты. Совсем недавно Ling et al. (2015), используя такую систему и специфические X факторы роста, изолировали пептид тейксобактин, из нового вида, граммотрицательных β -протеобактерий, получивших условное название *Eleftheria terrae* [88]. Выявлено, что этот пептид в очень низких концентрациях проявлял высокую актив-

ность против мультирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, а также ингибировал рост *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile* и *Bacillus anthracis*. Механизм его антимикробного действия, по-видимому, связан с ингибированием начальных стадий синтеза молекул бактериальной клеточной стенки.

Другие исследования для выявления новых антибактериальных агентов использовали против *Streptococcus pneumoniae* протеиново-липидный комплекс HAMLET, в состав которого входит человеческое грудное молоко и α -лактальбумин, смертельно опасный для опухолевых клеток. Этот природный комплекс убивал *Streptococcus pneumoniae* и не вызывал развитие резистентности [86].

Учёные многих стран уделяют большое внимание получению антибактериальных веществ различной химической природы из морских гидробионтов (беспозвоночных, водорослей, рыб). Нами ранее на страницах этого журнала были представлены материалы, освещающие антибактериальное и антибиоплённое действие полисахаридов из морских бактерий и водорослей [89, 90].

В литературе уже в течение нескольких десятилетий появляется большое число работ, освещающих антибактериальную, противовирусную и антифунгальную активность биологически активных веществ из органов, тканей и чернил головоногих моллюсков. Антимикробная активность характерна для экстрактов органов и тканей, гидролизатов, гемолимфы, чернил этих гидробионтов и фракций меланина [91–94]. При этом экстракты, гидролизаты и полученные из них соединения имеют индивидуальный спектр антибактериальной активности.

Высокой оценки заслуживают результаты исследований антимикробной активности БАВ из головоногих моллюсков по отношению к микроорганизмам с множественной устойчивостью к существующим антибиотикам.

Так, в биопродуктах из головоногих моллюсков содержатся субстанции, к которым чувствительны бактерии с расширенным спектром β -лактамаз [91]. Неочищенный гексановый экстракт чернил кальмара *L. duvauceli* проявил высокую активность по отношению к *E. coli* и *K. pneumoniae*. Размеры зоны ингибирования роста *E. coli* составили 18 мм, *K. pneumoniae* — 23 мм. Минимальная ингибирующая концентрация экстракта в среднем для обоих видов микроорганизмов составляла 2,5 мг/мл, бактериостатическая — 1,25 мг/мл.

Возбудитель туберкулёза — *M. tuberculosis* также приобрел множественную устойчивость к препаратам первой и второй линии, применяемым в настоящее время. В связи с этим большой интерес представляет работа по исследованию антитуберкулёзного действия метанольного экстракта из чернил каракатицы *Sepiella inermis* [95]. В со-

ставе экстракта были обнаружены омега-3 жирные кислоты и липиды, которые нарушают точную мембрану микроорганизмов [96].

Микроорганизмы с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам составляют основную массу госпитальных штаммов. По данным [97], экстракт из каракатицы *Sepia* sp. при заражении мышей госпитальными штаммами *S.aureus* и *E.coli* был более эффективен, чем антибиотик цефотаксим.

В литературе есть сообщения о том, что антибактериальная активность БАВ из головоногих моллюсков не уступает, а в отдельных случаях превосходит эффективность существующих антибиотиков. Так, Z. D. Degiam и A. T. Abas [67] использовали для сравнения *in vitro* с помощью метода диффузии в агар официальные препараты — амикацин, карбенициллин, тобрамицин, ципрофлоксацин, эритромицин и гентамицин. У тест-микроба *P.aeruginosa* отсутствовала чувствительность ко всем вышеперечисленным антибиотикам, взятым в эксперимент, в то время как экстракты из *Sepia* sp. и *Loligo* sp. образовывали зону ингибирования роста синегнойной палочки диаметром 23,6 мм и 18 мм, соответственно.

В связи с этим представляют интерес исследования A. Shanmugam et al., в которых из каракатицы *Euprimna berryi* были получены очищенные и неочищенные образцы гепарина и гепариноподобных гликозаминогликанов. В качестве тест-микробов авторы использовали *Bac.subtilis*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S.flexneri*, а также грибы — *Aspergillus fumigates*, *Fusarium* sp., *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium* sp. и *Candida albicans*.

При помощи метода диффузии в агар было установлено, что как очищенные, так и неочищенные образцы были активны против всех использованных в опытах микроорганизмов. Авторы обращают внимание на тот факт, что полисахаридные экстракты из каракатицы являются дешевым и эффективным источником высокоактивных антибактериальных и антигрибковых субстанций.

Достаточно много работ посвящено антибактериальному действию хитозана, полученного из головоногих моллюсков [69, 96]. Хитозан представляет собой полисахарид, состоящий из β -(1→4) связанного D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. Хитозан обычно получают из хитина, который найден в разных биологических источниках, в том числе, в моллюсках. При этом выход хитозана из головоногих моллюсков значительно выше, чем из традиционного источника хитозана — краба [82].

Антибактериальную активность хитозана объясняют взаимодействием между положительно заряженным хитозаном (протонированная аминокислотная группа) и отрицательно заряженной бактериальной мембраной (ЛПС в грамотрицательных

и липотейхоевая кислота в грамположительных бактериях). Это электрическое взаимодействие приводит к изменению проницаемости стенки микроба, что вызывает осмотический дисбаланс в бактерии и тем самым ингибирует рост микроорганизма. Кроме того, гидролиз пептидогликана в стенке микроорганизмов влечёт за собой утечку внутриклеточных электролитов, например, ионов калия и низкомолекулярных белковых компонентов (белки, нуклеиновые кислоты, лактат-дегидрогеназа).

Другой механизм взаимодействия микроорганизмов и хитозана заключается в том, что гидрофобность пиранозидного кольца хитозана способствует транслокации его внутрь гидрофобной хвостовой части липида [60]. В результате ингибируется синтез мРНК и белка бактерий. Вполне вероятно, что все описанные события происходят одновременно, но с разной интенсивностью.

В работе [96] авторы приводят гипотезы механизма антибактериального действия хитозана, полученного из кальмара *Sepioteuthis lessoniana* и предполагают, что водорастворимый хитозан увеличивает проницаемость клеточной мембраны, тем самым нарушая целостность бактериальных клеточных мембран с вытеканием содержимого бактериальных клеток. Что же касается водонерастворимого хитозана, то его молекулы могут покрывать поверхность бактериальных клеток, формируя непроницаемый слой вокруг бактерии и блокируя ее жизненно важные каналы. Такой слой, по-видимому, может предотвращать поступление в бактерию основных растворенных веществ, что также может дестабилизировать клеточную стенку, приводить к выходу содержимого и в конечном итоге привести к гибели бактерии. Наконец, N. Subhadrappa et al. [96] сообщают, что антибактериальный механизм действия хитозана кроме всего прочего может быть обусловлен аминокислотной группой остатка глюкозамина в положении C2. Авторы высоко оценивают антимикробное действие хитозана и считают его перспективным источником потенциальных фармакологических антимикробных агентов.

Многие авторы объясняют антибактериальную активность экстрактов из головоногих моллюсков присутствием в них антибактериальных пептидов, которые являются важным компонентом врожденного иммунитета, поскольку они не только уничтожают микроорганизмы, но и способны модулировать воспалительный ответ организма. Механизм действия этих соединений связан с наличием в их структуре положительно заряженных аминокислотных остатков, которые вступают в соединение с отрицательно заряженной мембраной микроорганизмов и проникают внутрь клетки.

Большой интерес представляет новый белок, лолдувин-S, полученный из чернил кальмара

L. duvauceli с м.м. 60 kDa и обладающий L-аминоксидазной активностью [91]. К лолдувину-S оказались чувствительными штаммы патогенных для человека бактерий (как грамположительных, так и грамотрицательных), продуцирующих расширенный спектр β -лактамаз (*E.coli*, *K.pneumoniae*), а также метициллино- и амфотерицинорезистентных *S.aureus*. Зона ингибирования роста *E.coli* и *K.pneumoniae* составила 20 мм и 21 мм соответственно, МПК лолдувина-S по отношению к этим микроорганизмам была равна 25 мкг/мл. Зона ингибирования роста *S.aureus* составляла 24 мм, МПК — 3,125 мкг/мл. Авторы обращают внимание на тот факт, что ценность лолдувина определяется его бактерицидной способностью по отношению к антибиотикоустойчивым штаммам бактерий и микроорганизмам с расширенным спектром β -лактамаз.

Таким образом, морской мир является источником новых терапевтических антибактериальных агентов с новыми, часто неожиданными механизмами действия. Медленное продвижение лекарственных препаратов на их основе на фармацевтический рынок связано с трудностью достижения требуемой точности и воспроизводимости партий, а это, в свою очередь, обусловлено не только уровнем развития медицинской науки, но и разобщённостью специалистов, недостаточно развитым междисциплинарным сотрудничеством учёных — биологов, молекулярных биологов, химиков, экологов, генетиков, фармакологов, врачей различных специальностей. По-видимому, в дальнейшем усилия учёных следует направить на получение низкомолекулярных фрагментов биологически активных соединений (полисахаридов, пептидов и пр.), оценку их способности связываться с различными рецепторами клеток организма, что позволит идентифицировать участки соединения, ответственные за тот или другой терапевтический эффект. После этого перспективные фрагменты будут синтезированы и определён спектр их действия.

Эти, несомненно, успешные и интересные результаты дают основания надеяться, что современные инновационные стратегии поиска новых антимикробных молекул откроют широкие перспективы для синтеза новых природных антибиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nitsch-Osuch A., Gyrzyk E., Wardyn A. et al. Antibiotic prescription practices among children with. Adv Exp Med Biol 2016; 905: 25—31.
2. Liu J.-H., Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016; 16 (2): 161—168.
3. Mills S., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. FEMS Microbiol Rev 2017; 41: S129—S153.
4. Behrens H.M., Six A., Walker D., Kleanthous C. The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics. Emerging Topics in Life Sciences 2017; 1 (1): 65—74.
5. Carlet J., Mainardi J.L. Antibacterial agents: back to the future. Can we live with only colistin, co-trimoxazole and fosfomycin? Clin Microbiol Infect 2012; 18 (1): 1—3.

Заключение

Мы живем на планете, где одновременно существуют сотни миллионов видов живых организмов, между которыми постоянно идет непримиримая борьба за жизненные пространства и питательные ресурсы. В процессе жизнедеятельности человечество столкнулось с поразительным свойством бактерий повышать свою устойчивость к химическим антибиотикам, широко используемым последние десятилетия для лечения и профилактики инфекционных заболеваний людей и домашних животных. В виду опасности полной потери их терапевтической эффективности в течение последующих 5 лет и возникновения реальной угрозы существованию человеческой популяции возрастает необходимость разработать альтернативные антимикробные стратегии, чтобы решить эту серьёзную проблему, с которой столкнулось современное общество.

В феврале 2016 г. Liu et al. [2] были опубликованы сведения об обнаружении плазмидного гена *mcr-1* в США и Китае, ответственного за приобретенную резистентность у патогенных штаммов *Escherichia coli* к колистину — бактериоцину из группы полимиксинов, антибиотик «последней надежды» против мультирезистентной микрофлоры с которым связывали свои надежды многие исследователи. Опасность состоит в передаче этого гена другим бактериям.

2 февраля 2017 года ВОЗ опубликовала список устойчивых к действию антибиотиков «приоритетных патогенов» — 12 видов бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека.

Эти сообщения подтверждают чрезвычайную актуальность поиска новых перспективных антимикробных стратегий.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток», проект № 18-5-099.

6. Одинцов В.Е., Стерликов С.А. Лекарственно-устойчивый туберкулез в пенитенциарных учреждениях. Медицинский альянс. 2013; 1: 68—73. / Odincov V.E., Sterlikov S.A. Lekarstvenno-ustojchivyy tuberkulez v penitencijnykh uchrezhdenijakh. Medicinskij al'jans. 2013; 1: 68—73. [in Russian]
7. Piddock L.V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol 2006; 19 (2): 382—402.
8. Lee H., Kim H.Y. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus* J Microbiol Biotechnol 2011; 21 (3): 229—235.
9. Rouveix B. Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria. J Antimicrob Chemother 2007; 59 (6): 1208—1209.
10. Stavri M., Piddock L.J., Gibbons S. Bacterial efflux pumps from natural sources. J Antimicrob Chemother 2007; 59 (6): 1247—1260.
11. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. et al. Rang & Dale's Pharmacology, 7th ed. Elsevier, Churchill Livingstone 2012.

12. Romanelli R.M., Clemente W.T., Lima S.S. et al. MRSA outbreak at a transplantation unit. *Braz J Infect Dis* 2010; 14 (1): 54–59.
13. Wardal E., Sadowy E., Hryniewicz W. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. *Pol J Microbiol* 2010; 59 (2): 79–87.
14. Martínez-Júlviz M., Rojas A.L., Olekhovich I. et al. Structure of RdxA: an oxygen insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. *J Fed Eur Biochem Soc* 2012; 279: 4306–4317.
15. Ojala V., Laitalainen J., Jalasvuori M. Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance. *Evol Appl* 2013; 6 (6): 925–932.
16. WHO. Antimicrobial Resistance 2015, Available online at www.who.int.
17. Abhilash M., Vidy A.G., Jagadevi T. Bacteriophage therapy: a war against antibiotic resistant bacteria. *Internet J Altern Med* 2009; 7 (1): e17744.
18. Hagens S., Loessner M.J. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010; 11 (1): 58–68.
19. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (3): 649–659.
20. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med* 2006; 231 (4): 366–377.
21. Chanishvili N. Phage Therapy-History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. *Literature Review* 2012; 778: 12–22. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
22. Hyman P., Abedon S.T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. In: Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*, vol. 70. Elsevier Academic Press Inc., San Diego, 2010; 217–248.
23. Wittebole X., de Roock S., Opal S.M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 2013; 4 (8): 1–10.
24. Maura D., Debarbieux L. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 2011; 90 (3): 851–859.
25. Chan B.K., Abedon S.T. Phage therapy pharmacology phage cocktails. In: Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*, vol. 78. Elsevier Academic Press Inc., San Diego, 2012; 1–23.
26. Edgar R., Friedman N., Molshanski-Mor S. et al. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (3): 744–751.
27. Schmelcher M., Powell A.M., Becker S.C. et al. Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (7): 2297–2305.
28. Schuch R., Pelzek A.J., Raz A. et al. Use of a bacteriophage lysin to identify a novel target for antimicrobial development. *PLoS One* 2013; 8 (4): e60754.
29. McGowan S., Buckle A.M., Mitchell M.S. et al. X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109 (31): 12752–12757.
30. Daniel A., Euler C., Collin M. et al. Synergism between a novel chimerical lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (4): 1603–1612.
31. Viertel T.M., Ritter K., Horz H.-P. Viruses versus bacteria — novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69 (9): 2326–2336.
32. Wernicki A., Nowaczek A., Urban-Chmiel R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virol J* 2017; 14 (1): 179.
33. Pirmay J., Verbeken G., Rose T. et al. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virol* 2012; 7 (4): 379–390.
34. Atterbury R.J. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microb Biotechnol* 2009; 2 (6): 601–612. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00089.
35. Ackermann H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 2007; 152 (2): 227–243. doi: 10.1128/JVI.02727-12.
36. Summers W.C. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage* 2012; 2 (2): 130–133.
37. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.J. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (3): 649–659.
38. Tamaki H., Zhang R., Angly F.E. et al. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environ Microbiol* 2012; 14 (2): 441–452.
39. Abedon S.T., Kuhl S.J., Blasdel B.G. et al. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011; 1 (2): 66–85. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.08.001.
40. Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ Health Perspect* 2013; 121 (2): 48–53.
41. Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B. et al. Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11 (1): 48–57.
42. Fenton M., Ross P., McAuliffe O. et al. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterial. *Bioeng Bugs* 2010; 1 (1): 9–16.
43. Kutateladze M. Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virol Sin* 2015; 30: 80–81. doi: 10.1007/s12250-014-3557-0.
44. Kawada-Matsuo M., Yoshida Y., Zendo T. et al. Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, nisin ISK-I and nisin A in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2013; 8 (7): e69455.
45. Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Rodríguez A. et al. The phage lytic proteins from the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB SauS-phiPLA88 display multiple active catalytic domains and do not trigger staphylococcal resistance. *PLoS One* 2013; 8 (5): e64671, doi: 10.1371/journal.pone.0064671.
46. Nishie M., Nagao J., Sonomoto K. Antibacterial peptides «bacteriocins»: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci* 2012; 17 (1): 1–16.
47. São-José C. Phage endolysins with broad antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* clinical strains. *Microbial Drug Resist* 2012; 18 (3): 322–332.
48. Gratia J.P. André Gratia: a forerunner in microbial and viral genetics. *Genetics* 2000; 156 (2): 471–476.
49. Bodaszewska-Lubas M., Brzywczy-Wloch M., Gosiewski T., Heczko P.B. Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins-pilot study. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; 66: 787–794.
50. Alvarez-Sieiro P., Montalbán-Lopez M., Mu D. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biot* 2016; 100: 2939–2951. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9.
51. Mathur H., Field D., Rea M.C. et al. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front Microbiol* 2017; 8: 1205. doi: 10.3389/fmicb.2017.01205.
52. Oldfield E., Feng X. Resistance-resistant antibiotics. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35 (12): 664–674.
53. Bruhn O., Grötzinger J., Cascorbi I. et al. Antimicrobial peptides and proteins of the horse — insights into a well-armed organism. *Vet Res* 2011; 42 (1): 98–119.
54. Björn C., Håkansson J., Myhrman E. et al. Anti-infectious and anti-inflammatory effects of peptide fragments sequentially derived from the antimicrobial peptide centrocin 1 isolated from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *AMB Express* 2012; 2 (1): 67–78.
55. Lohans C.T., Vederas J.C. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 386410. doi: 10.1155/2012/386410.
56. Nakatsuji T., Gallo R.L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol* 2012; 132 (3): 887–895.
57. Brand A.M., Kwaadsteniet M., Dicks L.M. The ability of nisin F to control *Staphylococcus aureus* infection in the peritoneal cavity, as studied in mice. *Lett Appl Microbiol* 2010; 51 (6): 645–649.
58. Desriac F., Defer D., Bourgougnon N., Brillet B., Le Chevalier P., Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs* 2010; 8 (4): 1153–1177.
59. Fernández L., Delgado S., Herrero H., Maldonado A., Rodríguez J.M. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J Hum Lact* 2008; 24 (3): 311–316. doi: 10.1177/0890334408317435.
60. Huang E., Zhang L., Chung Y., Zheng Z., Yousef A.E. Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 206917. doi: 10.1155/2013/206917.
61. Ianiro G., Tilg H., Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut* 2016; 65(11): 1906–1915. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312297.
62. Fernebro J. Fighting bacterial infections — future treatment options. *Drug Resist Updat* 2011; 14 (2): 125–139.
63. Ferrer M., Mendez-García C., Rojo D. et al. Antibiotic use and microbiome function. *Biochem Pharmacol* 2016; doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.007.
64. Gillor O., Nigro L.M., Riley M.A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr Pharm Des* 2005; 11 (8): 1067–1075.
65. Amer L.S., Bishop B.M., van Hoek M.L. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem. Biophys Res Commun* 2010; 396 (2): 246–251. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.073.
66. Aminov R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 2010; 1 (134): 17. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.
67. Degiam Z.D., Abas A.T. Antimicrobial activity of some crude marine *Mollusca* extracts against some human pathogenic bacteria. *Thi-Qar Medical J* 2010; 4 (3): 142–147.

68. Girija S.A., Vijayshree P.J., Pandi S.K. et al. Antibacterial effect of squid ink on ESBL producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Indian J Geo-Marine Sci 2012; 1: 41 (4): 338–343.
69. Park S.C., Nam J.P., Kim J.H., Kim Y.M., Nah J.W., Jang M.K. Antimicrobial action of water-soluble beta-chitosan against clinical multi-drug resistant bacteria. Int J Mol Sci 2015; 16: 7995–8007.
70. Livermore D.M. Future directions with daptomycin. J Antimicrob Chemother 2008; 62 (3): 41–49.
71. Kosciuczuk E.M., Lisowski P., Jarczak J., Strzalkowska N., Józ'wik, A., Horban'czuk J., Krzyż'ewski, J., Zwierzchowski L., Bagnicka E., Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. Mol Biol Rep 2012; 39 (12): 10957–10970.
72. Lavery G., Gorman S.P., Gilmore B.F. The potential of antimicrobial peptides as biocides. Int J Mol Sci 2011; 12 (10): 6566–6596.
73. Shanmugam A., Mahalakshmi T.S., Barwin V.A. Antimicrobial activity of polysaccharide isolated from the cuttlebone of *Sepia aculeata* (Orbigny, 1848) and *Sepia brevimana* (Steenstrup, 1875): an approach to selected antimicrobial activity for human pathogenic microorganisms. J Fish Aqua Sci 2008; 3(5): 268–274.
74. Aarestrup F.M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2015; 370 (1670): 20140085. doi: 10.1098/rstb.2014.0085.
75. Balu S., Reljic R., Lewis M.J. et al. A novel human IgA monoclonal antibody protects against tuberculosis. J Immunol 2011; 186 (5): 3113–3119. doi: 10.4049/jimmunol.1003189.
76. Bebbington C., Yarranton G. Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. Curr Opin Biotechnol 2008; 19 (6): 613–619. doi: 10.1016/j.copbio.2008.10.002
77. Berry J.D., Gaudet R.G. Antibodies in infectious diseases: polyclonals, monoclonals and niche biotechnology. N Biotechnol 2011; 28 (5): 489–501.
78. Ter Meulen J. Monoclonal antibodies in infectious diseases: clinical pipeline in 2011. Infect Dis Clin North Am 2011; 25(4): 789–802.
79. Tsang K.Y., Luk S., Lo J.Y. et al. Hong Kong experiences the «Ultimate superbug»: NDM-1 Enterobacteriaceae. Hong Kong Med J 2012; 18 (5): 439–441.
80. Xu T., Ying J., Yao X. et al. Identification and characterization of two novel bla (KLUC) resistance genes through large-scale resistance plasmids sequencing. PLoS One 2012; 7 (10): e47197.
81. Desbois A.P., Smith V.J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. See comment in PubMed Commons below Appl. Microbiol Biotechnol 2010; 85 (6): 1629–1642.
82. Jothi N., Kunthavai N. R. Isolation and identification of chitin and chitosan from cuttle bone of *Sepia prashadi* Winckworth. Int J Curr Sci 2014; 111: 18–25.
83. Schenkelberg T., Kieny M.P., Bianco A.E., Koff W.C. Building the Human Vaccines Project: strategic management recommendations and summary report of the 15–16 July 2014 business workshop. Expert Rev Vaccines 2015; 14(5): 629–636. doi: 10.1586/14760584.2015.1013466.
84. Seo M., Won H., Kim J. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. Molecules 2012; 17 (10): 12276–12286.
85. Riosa A.C., Moutinhoboc C.G., Pintoc F.C. et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. Microbiological Research 2016; 191: 51–80. doi: org/10.1016/j.micres.2016.04.008
86. Marks L.R., Clementi E.A., Hakansson A.P. et al. The human milk protein-lipid complex HAMLET sensitizes bacterial pathogens to traditional antimicrobial agents. PLoS One 2012; 7(8): e43514.
87. Nichols D., Cahoon N., Trakhtenberg E.M., Pham L., Mehta A., Belanger A., Kanigan T., Lewis K., Epstein, S.S. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of «uncultivable» microbial species. Appl Environ Microbiol 2010; 76 (8): 2445–2450.
88. Ling L.L., Schneider T., Peoples A.J., Spoering A.L., Engels I., Conlon B.P., Mueller A., Schäberle T.F., Hughes D.E., Epstein S., Jones M., Lazarides L., Steadman V.A., Cohen D.R., Felix C.R., Ashley Fetterman K., Millett W.P., Nitti A.G., Zullo A.M., Chen C., Lewis K. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature 2015; 517 (7535): 455–459.
89. Беседнова Н.Н., Ковалев Н.Н., Запорожец Т.С. и др. Головоногие моллюски — источники новых антимикробных субстанций. Антибиотики и химиотер 2016; 61 (1–2): 32–42. / Besednova N.N., Kovalev N.N., Zaporozhec T.S. i dr. Golovonogie molljuskij — istochniki novykh antimikrobykh substancij. Antibiotiki i khimioter 2016; 61 (1–2): 32–42. [in Russian]
90. Беседнова Н.Н., Макаренкова И.Д., Звягинцева Т.Н. и др. Ингибирующее действие полисахаридов морских гидробионтов на формирование биопленок. Антибиотики и химиотер 2016; 61 (9–10): 64–73. / Besednova N.N., Makarenkova I.D., Zvjaginceva T.N. i dr. Ingibirujushhee dejstvie polisakharidov morskikh gidrobiontov na formirovanie bioplenok. Antibiotiki i khimioter 2016; 61 (9–10): 64–73. [in Russian]
91. Girija S., Priyadharshini J.V., Suba P.K. et al. Isolation and characterization of LOLDUVIN-S: a novel antimicrobial protein from the ink of Indian squid *Loligo duvauceli*. Int J Curr Res 2012; (7): 4–14.
92. Monolisha S., Mani A.E., Patterson J., Patterson E. Molecular characterization and antimicrobial activity of *Octopus aegina* and *Octopus dofus* in gulf of mannar coasts. IJPSR 2013; 4 (9): 3582–3587.
93. Vasanthraja D., Ravichandirane V., Anandan V. Anti-microbial activity and spectro-chemical investigation of ink extracts of *Sepiella inermis* (Van Hasselt 1835). Not Sci Biol 2014; 6 (3): 273–275. doi: 10.1038/nrd3591.
94. Ravichandiran M., Thiripurasalini S., Ravichandirane V. et al. Chemical constituents and anti-tuberculosis activity of ink extracts of cuttlefish, *Sepiella inermis*. J Coast Life Med 2013; 1 (4): 253–257.
95. Derby C. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. Mar. Drugs. 2014; 12(5): 2700–2730.
96. Subhapradha N., Ramasamy P., Shanmugam V. et al. Physicochemical characterisation of β -chitosan from *Sepioteuthis lessoniana* gladius. See comment in PubMed Commons below Food Chem. 2013; 141 (2): 907–913

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Андрюков Борис Георгиевич — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Запорожец Татьяна Станиславовна — д. м. н., заместитель директора по научной работе НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

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

Вакцинация в ревматологии: настоящее и будущее

Б. С. БЕЛОВ, Д. В. БУХАНОВА, Г. М. ТАРАСОВА

НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва

Vaccination in Rheumatology: Present and Future

B. S. BELOV, D. V. BUKHANOVA, G. M. TARASOVA

V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow

В ревматологии значимость коморбидных инфекций за последнее время существенно увеличилась, особенно в связи с внедрением в клиническую практику генно-инженерных биологических препаратов. Одним из путей решения указанной проблемы является изучение и активное применение различных вакцин. В настоящем обзоре рассмотрены вопросы, касающиеся применения вакцин против гриппа, инфекций, обусловленных пневмококками, вирусами герпеса, папилломы человека и гепатита В у ревматологических больных. Обсуждается безопасность и иммуногенность вакцинации, связанной с предупреждением инфекций дыхательных путей как наиболее частой причины неблагоприятного исхода при ревматических заболеваниях. Обозначены основные направления будущих исследований по рассматриваемой проблеме.

Ключевые слова: ревматические заболевания, коморбидные инфекции, грипп, пневмония, хронические вирусные инфекции, вакцинация.

The significance of comorbid infections has significantly increased in rheumatology lately, especially in connection with the introduction of genetically engineered biological products into clinical practice. One way to solve this problem is to study and actively use various vaccines. This review examines issues related to the use of vaccines against influenza, pneumococcal infections, herpes viruses, human papillomavirus, and hepatitis B in rheumatological patients. The article discusses the safety and immunogenicity of vaccination associated with the prevention of respiratory tract infections as the most common cause of adverse outcome in rheumatological patients. The main directions of future research on the problem are indicated.

Keywords: rheumatic diseases, comorbid infections, influenza, pneumonia, chronic viral infections, vaccination.

Введение

В наступившем XXI веке инфекционные заболевания по-прежнему остаются актуальной социальной и медицинской проблемой. По данным ВОЗ, 25% всех летальных исходов в мире обусловлены инфекционными и паразитарными болезнями. Данный показатель увеличивается до 35% при учёте роли инфекций в неинфекционных клиниках.

В процессе эволюции инфекционной патологии открываются ранее неизвестные аспекты данной проблемы, требующие новых подходов к её диагностике, лечению и профилактике.

Коморбидные инфекции в ревматологии. Изложенное практически полностью относится к ревматологии, где в последнее время существенно увеличилась значимость коморбидных инфекций (КИ), особенно при системных болезнях соединительной ткани. У больных ревматоидным артритом

(РА) КИ развиваются в 1,5—2 раза чаще, чем в популяции, и являются второй по частоте (после активности болезни) причиной смерти пациентов [1]. При системной красной волчанке (СКВ) частота КИ составляет от 27 до 50%. При этом в качестве причин летальности инфекции занимают вторую позицию, уступая лишь активности болезни, а в некоторых работах — опережая её, и по данным мультивариантного анализа относятся к основным предикторам летального исхода [2]. В рамках многоцентрового исследования EUSTAR инфекции были причиной смерти 13% больных с системной склеродермией (ССД) [3]. О важности рассматриваемого вопроса также свидетельствует тот факт, что развитие катастрофического антифосфолипидного синдрома было связано с предшествующей инфекцией в 20—24% случаев [4,5].

В последнее время значимость проблемы КИ существенно возросла в связи с активным внедрением в клиническую практику генноинженерных биологических препаратов (ГИБП), действие которых направлено на специфические звенья патогенеза ревматических заболеваний (РЗ).

© Коллектив авторов, 2018

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

По мере накопления мирового клинического опыта стала чётко прослеживаться ассоциация применения ГИБП с нарастающим риском развития КИ различной природы и локализации.

Несмотря на достаточное количество антиинфекционных препаратов, решить только с их помощью все проблемы, связанные с инфекциями в ревматологии и других областях медицины, невозможно. Реальным выходом из этой ситуации представляется создание, совершенствование и внедрение в клиническую практику различных вакцин. Иммунизация является одним из самых эффективных методов профилактики инфекций и наиболее важным достижением медицины XX века. В то же время большинство хронических заболеваний, прежде всего аутоиммунной природы, многие практикующие врачи продолжают рассматривать как противопоказания для вакцинации.

Не могут ли механизмы, которые обуславливают повышенную восприимчивость больных РЗ к инфекциям, вызвать ослабленный иммунный ответ на вакцину? Не приведет ли вызванная вакциной активация иммунной системы к развитию или обострению уже имеющегося РЗ? Эти два вопроса оставались до последнего времени главными сдерживающими факторами широкого применения вакцинации в ревматологии. Считалось, что такой подарок человечеству от Эдварда Дженнера и Луи Пастера как вакцинация — это своего рода троянский конь. На протяжении десятилетий утверждалось, что в ответ на вакцинацию в ходе длительной моноклональной активации иммунокомпетентных клеток может произойти сбой в работе механизмов, отвечающих за иммунологическую толерантность к аутологичным структурам человеческого организма.

В настоящее время накоплены многочисленные данные, свидетельствующие об отсутствии какого-либо значимого негативного влияния иммунизации на течение основного РЗ [6—8]. Однако, несмотря на имеющиеся рекомендации Европейской антиревматической лиги (European League Against Rheumatism — EULAR) [9], Американской коллегии ревматологов (American College of Rheumatology — ACR) [10], Американского общества инфекционных болезней (Infectious Diseases Society of America — IDSA) [11], а также других международных и национальных медицинских ассоциаций, многие практикующие врачи по-прежнему продолжают рассматривать аутоиммунные заболевания как противопоказание для вакцинации. По данным международного одномоментного исследования COMORA, включавшего более 4500 больных РА, частота охвата вакцинацией против гриппа и пневмококковой инфекции среди больных РЗ была достаточно низкой (субоптимальной) и составила — 25,3 и 17,2%, соответственно [12]. Основными причи-

нами низкого охвата вакцинацией больных ревматологического профиля являются отсутствие рекомендаций со стороны лечащих врачей и их обеспокоенность в связи с возможными нежелательными эффектами [13—16].

Ниже будут рассмотрены вопросы, касающиеся применения отдельных вакцин при РЗ.

Грипп. В конце 1970 гг. в США в рамках Национальной программы по вакцинации против гриппа было выполнено 5 аналогичных по дизайну исследований [17—21], имевших целью изучить эффективность и переносимость моно- и бивалентной гриппозных вакцин у больных СКВ в неактивной фазе заболевания. В абсолютном большинстве случаев продемонстрирована высокая иммуногенность вакцины, показатели сероконверсии были аналогичны таковым в контрольной группе. Обострение заболевания зарегистрировано у 4 из 125 (3,2%) вакцинированных больных СКВ и у 1 из 21 (4,8%) пациента без вакцинации.

Голландские авторы отметили у больных СКВ снижение Т-клеточного иммунного ответа на гриппозную вакцину, связанное с терапией преднизолоном и/или азатиоприном [22]. Нарастание показателей сероконверсии и среднего геометрического титра (СГТ) поствакцинальных антител при повторной (бустерной) вакцинации наблюдалось только у больных СКВ, не вакцинированных в течение предыдущего года [23].

Несомненного внимания заслуживает выполненное во Франции многоцентровое исследование иммуногенности и безопасности вакцинации против сезонного и пандемического (H1N1) гриппа у больных с различными аутоиммунными заболеваниями. Как видно из таблицы, основные параметры иммуногенности как сезонной, так и эпидемической вакцинации (с учётом среднего возраста пациентов — $53,4 \pm 15,1$ лет) удовлетворяли требованиям Европейского комитета по гриппозным вакцинам [24]. Применение глюкокортикоидов (ГК) и цитостатиков не оказывало существенного влияния на показатели поствакцинального ответа, по сравнению с ГИБП. Наблюдался 15 случаев развития гриппоподобного синдрома и 6 случаев легко протекавшего обострения основного заболевания, которые имели временную взаимосвязь с иммунизацией. По мнению авторов, вакцинация против гриппа у данной категории больных может быть расценена как эффективная и безопасная [25].

Данные крупного ретроспективного когортного исследования, включавшего 46030 больных РА, подчеркивают важность проблемы гриппа у этих пациентов. Частота инфекции, вызванной вирусом гриппа, при РА значительно превышала таковую в контроле (относительный риск — ОР 1,22, 95% доверительный интервал — ДИ 1,05–1,41). При этом осложнения, обусловленные ука-

Показатели иммунного ответа на вакцинацию против сезонного и эпидемического (H1N1) гриппа у больных с аутоиммунными РЗ [25]

Параметры	В целом	Отдельные РЗ			Иммуносупрессивная терапия		
		СНВ	ССД	СКВ	А	В	С
Сезонная вакцина							
<i>n</i>	173	62	33	28	75	94	15
Серопротекция, <i>n</i> (%)	139 (80,3)	49 (79)	29 (87,9)	20 (71,4)	65 (86,7)	75 (79,8)	9 (60)
Сероконверсия, <i>n</i> (%)	55 (39,6)	12 (41,4)	12 (41,4)	11 (55)	31 (47,7)	30 (40)	1 (11,1)
СГТ (исходно)	22,1	20,1	24,3	18,4	22,11	23,7	13,48
СГТ (3 нед.)	88,7	82,9	88,3	89,1	106,9	92,1	31,4
СГТ (9 нед.)	77,3	75,7	75,9	79,8	85	83,7	32,2
Пандемическая вакцина							
<i>n</i>	197	79	34	32	86	108	16
Серопротекция, <i>n</i> (%)	127 (64,5)	51 (64,6)	24 (70,6)	21 (65,6)	59 (68,6)	68 (63)	5 (31,3)
Сероконверсия, <i>n</i> (%)	91 (71,7)	40 (78,4)	13 (54,2)	18 (85,7)	42 (71,9)	47 (69,1)	5 (100)
СГТ (исходно)	13,4	12,9	19,7	12,1	15	13,6	7,4
СГТ (3 нед.)	40,7	41,8	45,5	49	48,2	40,2	12,5
СГТ (6 нед.)	50,3	52,3	60,3	62,4	62,5	47,4	14,6
СГТ (6 мес.)	27,8	30,4	32,8	24,9	30,5	27,1	10

Примечание. СНВ — системные некротические васкулиты. Иммуносупрессивная терапия: А — отсутствие таковой или преднизолон в дозе ≤ 10 мг/сут., В — преднизолон в дозе ≥ 10 мг/сут и/или иммуносупрессоры; С — ГИБП (РТМ, АДА, ЭТЦ, ИНФ).

занной инфекцией, среди больных РА развивались в 2,75 раза чаще по сравнению с контролем и встречались преимущественно у мужчин в возрасте старше 70 лет [26].

В соответствии с базой данных PubMed, за последние 5 лет опубликовано около 60 работ, посвящённых применению вакцин против гриппа у больных РА. В частности, в ходе многоцентрового когортного исследования показатели серопротекции, сероконверсии фактора конверсии после иммунизации инактивированной моновалентной пандемической (H1N1) гриппозной вакциной составили 61,5%, 53,1% и 7,5 среди 260 больных РА и 85,5%, 78,3% и 16,5 в группе из 83 пациентов с ювенильным идиопатическим артритом, соответственно. Переносимость вакцинации была хорошей, серьёзных нежелательных явлений не наблюдали [27].

В настоящее время ведутся активные исследования по иммуногенности и безопасности вакцин против гриппа (а также и других) у больных РА, получающих как базисные противовоспалительные препараты (БПВП), так и ГИБП. Показано, что у больных РА, получавших метотрексат (МТ) и/или ингибиторы фактора некроза опухоли- α (иФНО- α), достигаются приемлемые уровни гуморального поствакцинального ответа, хотя и более низкие, чем в контроле [28–32]. По данным J. Park и соавт., у больных РА, получавших стабильную дозу МТ, временная отмена препарата (за 2 недели до иммунизации) ассоциировалась с улучшенным гуморальным ответом на вакцину против сезонного гриппа. Подчеркивается необходимость дальнейших исследований, чтобы ответить на вопросы: снижает ли прекращение приема МТ частоту гриппа и не ухудшается ли при этом течение болезни [33].

Отсутствие значимого влияния тоцилизумаба (ТЦЗ) на постиммунизационный ответ при ис-

пользовании 3-валентной сплит-вакцины продемонстрировано в работе японских авторов [34]. Применение абатацепта (АБЦ) в виде внутривенных инфузий у больных РА вело к значимому снижению постиммунизационного ответа на вакцину против эпидемического (H1N1) гриппа по сравнению с пациентами, получавшими МТ, и контролем [35]. С другой стороны, при назначении АБЦ в форме для подкожного введения частота серопротекции по отношению к 2 из 3 антигенов сезонной противогриппозной вакцины составила 82,1% [36], что полностью соответствовало вышеуказанным требованиям Европейского комитета.

В ряде исследований показана выраженная ингибция поствакцинального ответа при лечении ритуксимабом (РТМ) [37, 38], подтверждённая данными метаанализа [39]. В то же время среди больных, вакцинированных спустя 6–10 мес после применения РТМ, отмечен достоверный рост поствакцинальных уровней СГТ и показателей фактора конверсии. Данное обстоятельство в определённой степени указывает на возможность восстановления иммунного ответа через указанный период после применения РТМ [37].

Сообщение шведских авторов посвящено влиянию различных схем лечения на иммунный ответ после применения вакцины против пандемического гриппа у 291 больного РА и спондилоартропатиями (СпА). В зависимости от проводимой терапии показатели позитивного постиммунизационного ответа были следующими: РА+МТ — 42%, РА+иФНО- α — 53%, РА+иФНО- α + МТ — 43%, РА+АБЦ — 20%, РА+РТМ — 10%, РА+ТЦЗ — 50%, СпА+иФНО- α — 76%, СпА+иФНО- α + МТ — 47%, СпА+нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) — 59%. У больных, получавших РТМ, наблюдали значимо более низкий ($p < 0,001$) иммунный ответ по сравнению с други-

ми исследуемыми группами. Возраст старше 60 лет был значимым прогностическим фактором сниженного постиммунизационного ответа ($p < 0,001$). Протективные уровни антител поддерживались в среднем в течение 22 мес после вакцинации, кроме пациентов, получавших РТМ [40].

Результаты применения неадьювантной вакцины против гриппа А (А1Н1) у 58 больных дерматомиозитом/полимиозитом и у 116 лиц здорового контроля проанализированы бразильскими авторами. Через 3 нед после вакцинации показатели сероконверсии ($p = 0,394$), серопротекции ($p = 0,08$), СГТ ($p = 0,573$) и фактора конверсии ($p = 0,496$) были аналогичными в обеих группах. Параметры активности заболевания, включая оценку по визуальной аналоговой шкале — ВАШ врачом и больным, индекс мануального тестирования мышечной силы ММТ-8, сывороточные концентрации креатинкиназы и альдолазы, на протяжении исследования значимо не изменялись. Какого-либо влияния проводимой терапии (ГК $\pm$ цитостатики) на показатели иммунного ответа не выявлено. Наблюдаемые локальные и системные поствакцинальные неблагоприятные реакции (НР) были слабо выраженными, между группами не было значимых различий по частоте НР. Авторы констатируют хорошую иммуногенность и переносимость вакцины и подчёркивают необходимость изучения её безопасности на отдаленных сроках после иммунизации [41].

Итальянские исследователи наблюдали 50 больных ССД, у которых применение вирусомальной вакцины против гриппа привело к повышению содержания постиммунизационных антител до протективного уровня в 80% случаев. Клинические и лабораторные признаки, свидетельствующие о негативном влиянии вакцинации на течение основного заболевания, отсутствовали [42]. Бразильскими авторами выполнено исследование «случай—контроль», включавшее 92 больных ССД, которые были иммунизированы неадьювантной вакциной против пандемического гриппа Н1Н1. Вакцинация расценена как безопасная и эффективная независимо от субтипа болезни, тяжести течения, проводимой терапии и может быть рекомендована для ежегодного применения у этих пациентов [43].

Пневмококковая инфекция. Пневмонии занимают лидирующее место в структуре инфекционных осложнений среди пациентов с РЗ (22—67%). По данным ретроспективного когортного исследования, выполненного британскими учёными, риск инвазивной пневмококковой инфекции (включая пневмонию) значимо нарастал у госпитализированных больных РА (отношение шансов — ОШ 2,47 95% ДИ 2,41 2,52), СКВ (ОШ 5,0 95% ДИ 4,6 5,4), узелковым полиартериитом (ОШ 5,0 95% ДИ 4,0 6,0), ССД (ОШ 4,2 95% ДИ 3,8 4,7), синдромом

Шегрена (ОШ 3,2 95% ДИ 2,9 3,5), анкилозирующим спондилитом (ОШ 1,96 95% ДИ 1,1 3,3) [44].

У больных СКВ частота пневмоний составляет 6—23%. Несколько меньше этот показатель среди пациентов с РА — 2,4—8,3% или 5,9—17 случаев на 1000 пациенто-лет. Летальность от пневмонии у больных РЗ в целом составляет 11—22%, при СКВ — 23—27%. По данным европейского многоцентрового исследования инфекции встречались в 30% случаев среди причин смерти стационарных больных СКВ, чаще всего это была пневмония. При РА летальность от пневмонии составила 8—22%, при ССД — 12% [1, 45—47].

В редакционной статье «Journal of Rheumatology» подчеркивается, что «...безопасность и иммуногенность вакцин против пневмококка и вируса гриппа, о которых впервые сообщалось в конце 1970 гг., теперь при СКВ подтверждена. Доказательства обострения болезни отсутствуют. У больных СКВ формируются протективные антитела, несмотря на активность болезни и применение иммуносупрессоров. Интересно, что гуморальный иммунный ответ на эти вакцины является антигеноспецифическим и не зависит от продукции антител к ДНК, а индукция аутоиммунного феномена является редким событием» [48].

В многоцентровом слепом исследовании после назначения 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины (ППВ-23) частота достижения протективного уровня антител среди больных РА, получавших адалимумаб (АДА), практически не отличалась от таковой в плацебо-контроле (85,9 и 87%, соответственно) [31]. В другой работе, включавшей 149 больных РА, поствакцинальный ответ на пневмококковые антигены 23F и 6В у пациентов, которым проводилась терапия инфликсимабом (ИНФ) или этанерцептом (ЭТЦ), был значительно более выраженным, чем при использовании комбинированного лечения ($p = 0,037$) или монотерапии МТ ($p < 0,001$) [49].

В исследовании VISARA значимый гуморальный ответ на 6 и более антигенов ППВ-23 был достигнут у 60% больных РА, получавших комбинацию ТЦЗ и МТ и 71% — на фоне монотерапии МТ. В связи с этим, авторы рекомендуют проводить иммунизацию указанной вакциной до начала терапии ТЦЗ [50].

В ходе многоцентрового контролируемого сравнительного исследования сопоставляли иммуногенность и безопасность столбнячного анатоксина (Т-клеточнозависимый антиген) и ППВ-23 (Т-независимый антиген) у больных РА, получавших РТМ в сочетании с МТ или МТ без РТМ (контрольная группа). Иммунизацию вышеуказанными вакцинами выполняли через 24 и 28 нед, соответственно, от начала лечения РТМ. Ответ на противостолбнячную вакцину был аналогичным в обеих группах. Однако доля больных с поствакцинальным ответом к каждо-

му из 12 пневмококковых серотипов через 4 нед после иммунизации была существенно снижена при использовании РТМ. У этих же больных также были снижены поствакцинальный ответ на определённое количество серотипов пневмококка и постиммунизационные СГТ антипневмококкового IgG по сравнению с пациентами, получавшими МТ в отдельности. Случаев обострения РА или развития серьёзных инфекций не наблюдали [51]. О выраженном ингибирующем влиянии РТМ в отношении гуморального ответа на пневмовакцину сообщают и другие авторы [40, 52]. Подчеркивается, что у больных РА, получающих РТМ, иммунизация пневмококковой вакциной является безопасной, но для повышения поствакцинального ответа она должна быть выполнена до начала анти-В-клеточной терапии.

Учитывая сниженный гуморальный ответ на ППВ-23 у больных РА при лечении АБЦ, эксперты Французского общества ревматологов считают оптимальной временную отмену данной терапии за три месяца до любой вакцинации. В случае явной необходимости иммунизация инактивированными вакцинами может быть проведена в любое время [53].

Результаты выполняемого в НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой исследования свидетельствуют о достаточной иммуногенности, клинической эффективности и хорошей переносимости ППВ-23 у 110 испытуемых, включая 79 больных РА. В течение 24-месячного периода наблюдения клинических и рентгенологических симптомов пневмонии не зарегистрировано ни в одном случае. У больных РА и в группе контроля отмечено более чем двукратное значимое повышение содержания пневмококковых антител через 3 мес после вакцинации. Несмотря на снижение их концентрации к 12-му месяцу, последняя оставалась на должном уровне и значимо повышалась к 24-му месяцу наблюдения. Во всех случаях отмечено благоприятное течение поствакцинального периода. У 72 (65%) лиц каких-либо НР на вакцину не наблюдалось, у 38 (35%) — отмечены боль, припухлость и гиперемия кожи диаметром до 2 см в месте инъекции, субфебрилитет. Указанные реакции расценены как типичные поствакцинальные. Они не имели связи с проводимой терапией, не требовали изменения схем лечения РА и полностью регрессировали в течение суток без применения дополнительных мер. Эпизодов обострения РА или возникновения каких-либо новых аутоиммунных расстройств не отмечали [54].

В ходе несравнительного исследования, включавшего 18 больных ССД, ≥ 2 -кратный постиммунизационный ответ на три и более антигена ППВ-23 наблюдали в 83% случаев независимо от проводимой терапии циклофосфамидом. Переносимость вакцины была хорошей, в 2 случаях отмечали боль в месте инъекции. В течение 1 года

случаев пневмонии или почечной патологии не зарегистрировано [55].

С учётом современных рекомендаций (EULAR.ACR и др.) иммунизация гриппозной и пневмококковой вакцинами показана больным аутоиммунными воспалительными РЗ (АВРЗ), поскольку среди них риск летальных исходов от инфекций дыхательных путей достаточно высок. Для достижения оптимального иммунного ответа у больных АВРЗ вакцинацию следует проводить до назначения ГИБП. При необходимости возможно назначение вакцинации на фоне терапии как БПВП, так и иФНО- α . В то же время, как указывалось выше, больным АВРЗ, которым планируется терапия РТМ, вакцинация должна быть назначена до начала лечения. Если же такое лечение уже проводится, то вакцинацию необходимо выполнить как минимум через 6 мес после начала анти-В-клеточной терапии, но не менее чем за 4 нед до следующего курса.

В соответствии с рекомендациями Американского комитета по практике иммунизации (Advisory Committee on Immunization Practices) [56] и Междисциплинарного комитета экспертов РФ [57] вакцинацию взрослых больных, получающих иммуносупрессивную терапию, необходимо начинать с 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины (ПКВ-13). После ПКВ-13 не раньше, чем через 8 нед, может быть введена ППВ-23, вторая доза ППВ-23 — через 5 лет. На наш взгляд, подобный подход к вакцинопрофилактике пневмококковых инфекций у взрослых пациентов ревматологического круга весьма неоднозначен, он требует дальнейшего изучения и подтверждения его целесообразности в ходе соответствующих клинических исследований. В частности, остается неясным вопрос об иммуногенности пневмококковых конъюгированных вакцин у больных РЗ на фоне проводимой терапии. Так, по имеющимся данным, назначение 7-валентной ПКВ (ПКВ-7) больным РА не обеспечивает должного поствакцинального ответа через 1,5 года после иммунизации. Кроме того, МТ, являющийся препаратом выбора для больных РА, значимо снижает уровень гуморального ответа у этих пациентов после их иммунизации ПКВ-7 и ПКВ-13 [52, 58]. Голландскими учёными показано, что иФНО α , являющиеся препаратами выбора из группы ГИБП для больных РА и АС, подавляют индукцию Т-зависимого иммунного ответа и таким образом блокируют путь реализации профилактического эффекта всех конъюгированных вакцин, включая ПКВ-7 и ПКВ-13. При этом Т-независимый гуморальный ответ (в т.ч. на ППВ-23) блокируется в значительно меньшей степени [59]. Отсутствие значимого ингибирующего влияния иФНО α на иммуногенность ППВ-23 у больных РА подтверждено другими авторами [60]. Француз-

ские исследователи показали, что последовательное применение ПКВ-13 и ППВ-23 безопасно у больных СКВ, но не даёт преимуществ в иммуногенности по сравнению с таковой при назначении ППВ-23 в отдельности [61].

Герпес-вирусные инфекции. В многочисленных работах продемонстрировано нарастание риска развития герпес-вирусной инфекции у больных с воспалительными РЗ (СКВ, РА, васкулиты, дерматомиозит/полимиозит и др.) по сравнению с популяционным контролем. Так, анализ крупной базы данных показал, что скорректированные показатели частоты *Herpes zoster* среди больных СКВ, воспалительными заболеваниями кишечника, РА в возрасте ≥ 40 лет превышали таковые среди здоровых лиц старше 60 лет, составляя — 14,1, 8,4, 7,5 и 3,0 на 1000 пациенто-лет, соответственно. Указанные больные рассматриваются как потенциальные кандидаты для вакцинации против *H.zoster*-инфекции [62].

В метаанализе, объединившем данные 6 регистров, риск развития *H.zoster* у больных РА при лечении ИФНО α составил 1,56 ($p=0,009$). Частота тяжёлых форм *H.zoster* у этих пациентов примерно в 2–4 раза выше, чем при назначении БПВП (4,29–20,9% и 2,0–5,5%, соответственно) [63]. Отмечен повышенный риск развития опоясывающего герпеса у больных РА при лечении ингибитором янус-киназы I–III типов тофацитинибом, особенно в сочетании с ГК [64].

В связи с изложенным вопросы вакцинации против герпесвирусной инфекции приобретают всё большую актуальность. По данным пилотного 12-недельного исследования, иммунный ответ на вакцину против *H.zoster* у больных СКВ был приемлемым, но ниже, чем в контрольной группе. В течение периода наблюдения случаев герпесвирусной инфекции, серьёзных НР или обострений СКВ не отмечали [65].

При ретроспективной оценке эффективности и переносимости противогерпетической вакцины более чем у 400 тыс пациентов (в том числе больных РА и АС), частота герпесвирусной инфекции у вакцинированных составила 6,7, у невакцинированных — 11,6 на 1000 пациенто-лет. В течение 2 лет наблюдения не зарегистрировано ни одного случая герпесвирусной инфекции среди больных, получавших ГИБП. В целом риск развития указанной инфекции у вакцинированных пациентов был значимо ниже и составил 0,61 (95% ДИ 0,52–0,71) [66].

Анализ отдалённых результатов оценки эффективности противогерпетической вакцины у больных с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями показал, что среди иммунизированных риск *H.zoster*-инфекции был значимо ниже в течение первого года наблюдения с постепенным выравниванием различий через 5

лет. По мнению авторов, полученные данные, по всей вероятности, свидетельствуют о необходимости бустерной вакцинации против указанной инфекции [67].

Эксперты EULAR считают целесообразной *H.zoster*-вакцинацию у больных с АВРЗ только при наличии антител к этому возбудителю (для исключения первичного заражения). Учитывая, что иммунизация против *H.zoster* проводится живой аттенуированной вакциной, её следует выполнять, как минимум, за один месяц до начала терапии ГИБП и не ранее, чем через 6 мес после окончания последней. Подчёркивается необходимость проведения крупных проспективных исследований с целью определения оптимальных интервалов времени для ревакцинации, а также дальнейшей оценки безопасности вакцины, особенно при лечении ГИБП. Большие надежды связывают с созданием инактивированных или субъединичных вакцин против *H.zoster*, что позволит повысить их безопасность [6, 68, 69].

Вирус папилломы человека. Инфекции, вызываемые вирусом папилломы человека (ВПЧ), отличаются высокой контагиозностью и значительным уровнем малигнизации. Высокоонкогенные типы ВПЧ выявляются почти в 100% случаев рака шейки матки. После инфицирования ВПЧ уже через 3 года у 27% женщин развивается цервикальная интраэпителиальная неоплазия высокой степени. При этом наиболее опасным фактором прогрессирования является длительная (более двух лет) персистенция ВПЧ.

Бразильские исследователи изучали распространённость ВПЧ среди пациенток с СКВ и оценивали ассоциированные факторы риска, включая применение иммуносупрессоров. Несмотря на значительно меньшее количество факторов риска, у пациенток с СКВ заболеваемость ВПЧ оказалась практически в три раза выше, чем в контрольной группе (20,2 и 7,3%, соответственно, $p=0,0001$). Прослежены значимые ассоциации уровня инфицированности с иммуносупрессивной терапией [70]. В работе L. Lyrio и соавт. риск развития ВПЧ-инфекции при СКВ был повышен в 7,2 раза (95% ДИ 2,9–17,8, $p=0,0001$) [71]. Это свидетельствует о необходимости увеличения количества плановых гинекологических обследований женщин, страдающих СКВ, а также решения вопроса о ВПЧ-вакцинации.

В ходе исследования «случай–контроль» (по 50 больных СКВ в каждой группе) изучали иммуногенность и безопасность квадριвалентной ВПЧ-вакцины. Через 12 мес после вакцинации показатели сероконверсии по отношению к наиболее значимым НРВ-серотипам (6, 11, 16, 18) в исследуемой и контрольной группах составили 82, 89, 95, 76% и 98, 98, 98, 80%, соответственно. Лечение преднизолоном и микофенолата моффе-

тилом ассоциировалось с более низким иммунным ответом на вакцину. У 5% исследуемых лиц наблюдались местные поствакцинальные реакции. Частота обострений СКВ в течение периода наблюдения в обеих группах не различалась ($p=0,81$) [72]. О безопасности ВПЧ-иммунизации при СКВ свидетельствуют и другие авторы [73].

В соответствии с имеющимися рекомендациями, вакцинация против ВПЧ показана всем пациенткам с СКВ вплоть до 25-летнего возраста [9, 74, 75].

Вирус гепатита В. Курация больных РЗ в рамках хронической инфекции, вызванной вирусом гепатита В (HBV) представляется весьма актуальной клинической проблемой. Частота HBV-носительства среди больных РА и спондилоартропатиями колеблется от 10 до 51% [76–77]. Другими не менее важными причинами неудач в лечении являются гепатотоксичность ряда противоревматических препаратов и возможность реактивации HBV-инфекции. Случаи развития последней описаны практически для всех ГИБП (кроме секукиумаба), зарегистрированных в Российской Федерации.

В качестве кандидатов для вакцинации против HBV-инфекции рассматриваются, в первую очередь, пациенты с РА, у которых в сыворотке крови при скрининговом обследовании перед планируемым проведением терапии ГИБП отсутствуют австралийский антиген и антитела к сердцевинному (сoг) антигену. В работе О. Elkaуam и соавт. вакцинация против HBV была выполнена у 22 больных РА, получавших БПВП (МТ, азатиоприн, соли золота). Положительный поствакцинальный ответ зарегистрирован в 68% случаев [78]. С другой стороны, в исследовании испанских авторов, включавшем 25 больных РА и 28 АС, которые получали ИНФ, постиммунизационный ответ на HBV-вакцину отсутствовал в 96 и 89% случаев, соответст-

венно [79]. Полученные результаты совпадают с вышеприведенными данными о блокировании Т-зависимого гуморального ответа для конъюгированных вакцин со стороны иФНО α и свидетельствуют о необходимости изучения и внедрения альтернативных схем вакцинации против гепатита В у больных РЗ, получающих ГИБП.

Заключение

Таким образом, вопросы КИ при РЗ по-прежнему сохраняют свое значение. При этом весьма значимой, но крайне мало разработанной и практически не получившей свое освещение в отечественной литературе представляется проблема Пн, которые лидируют в структуре серьезных КИ среди больных ревматологического круга. Исходя из вышеизложенного, крайне своевременно и необходимо выполнение на территории РФ единой научной программы, состоящей из серии исследований работ, затрагивающих различные стороны данной проблемы, в том числе эффективность и безопасность вакцинации.

Данные литературы по указанной проблематике говорят о том, что вакцинация представляет собой мощнейший метод предупреждения инфекционных заболеваний, которые являются крайне важной проблемой для пациентов с РЗ. Вакцинация необходима даже для больных, у которых ожидается субоптимальный ответ. Несомненно, что в целях отработки более четких показаний для вакцинации, определения временных интервалов для ревакцинации, оценки эффективности и безопасности различных вакцин (в первую очередь против гриппа и пневмококковых), а также изучения влияния на результаты иммунизации различных антиревматических препаратов у больных РЗ необходимы дальнейшие многоцентровые крупномасштабные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wolfe F., Mitchell D.M., Sibley J.T. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37 (4): 481–494.
2. Edwards C.J., Lian T.Y., Badsha H., Teh C.L., Arden N., Chng H.H. Hospitalization of individuals with systemic lupus erythematosus: characteristics and predictors of outcome. *Lupus.* 2003; 12(9): 672–676.
3. Tyndall A.J., Bannert B., Vonk M., Airò P., Cozzi F., Carreira P.E. et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69 (10): 1809–1815.
4. Решетняк Т.М. Антифосфолипидный синдром: клиника, диагностика, вопросы патогенеза. Автореф. дисс... докт. мед. наук. М.: 1999; 57. / Reshetnyak T.M. Antifosfolipidnyjsindrom: klinika, diagnostika i voprosy patogeneza. Avtoref. diss... dokt. med. nauk. M.: 1999; 57. [in Russian]
5. Asherson R.A., Shoenfeld Y. The role of infection in the pathogenesis of catastrophic antiphospholipid syndrome-molecular mimicry? *J Rheumatol* 2000; 27 (1): 12–14.
6. Perry L.M., Winthrop K.L., Curtis J.R. Vaccinations for rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2014; 16 (8): 431.
7. Friedman M.A., Winthrop K. Vaccinations for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2016; 28 (3): 330–336.
8. Friedman M.A., Winthrop K.L. Vaccines and Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: Practical Implications for the Rheumatologist. *Rheum Dis Clin North Am.* 2017; 43(1): 1–13.
9. van Assen S., Agmon-Levin N., Elkayam O., Cervera R., Doran M.F., Dougados M. et al. EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70 (3): 414–422.
10. Singh J.A., Saag K.G., Bridges S.L. Jr, Akl E.A., Bannuru R.R., Sullivan M.C. et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68 (1): 1–26.
11. Rubin L.G., Levin M.J., Ljungman P., Davies E.G., Avery R., Tomblyn M. et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 2014; 58 (3): e44–100.
12. Dougados M., Soubrier M., Antunez A., Balint P., Balsa A., Buch M.H. et al. Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). *Ann Rheum Dis* 2014; 73 (1): 62–68.
13. Lawson E.F., Trupin L., von Scheven E., Yelin E.H., Yazdany J. Reasons for failure to obtain influenza and pneumococcal vaccines among immunosuppressed individuals with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 10: Suppl: 362.
14. Krasselt M., Baerwald C., Seifert O. Insufficient vaccination rates in patients with systemic lupus erythematosus in a German outpatient clinic. *Z Rheumatol* 2017 Dec 13. doi: 10.1007/s00393-017-0410-5.
15. Kapetanovic M.C. Do encourage your scleroderma patients at risk to get influenza vaccine. *Rheumatology.* 2017 Oct 25. doi: 10.1093/rheumatology/kex380

16. Brocq O., Acquacalda E., Berthier F., Albert C., Bolla G., Millasseau E. et al. Influenza and pneumococcal vaccine coverage in 584 patients taking biological therapy for chronic inflammatory joint: A retrospective study. *Joint Bone Spine* 2016; 83 (2): 155–159.
17. Williams G.W., Steinberg A.D., Reinertsen J.L., Klassen L.W., Decker J.L., Dolin R. Influenza immunization in systemic lupus erythematosus. A double-blind trial *Ann Intern Med* 1978; 88 (6): 729–734.
18. Brodman R., Gilfillan R., Glass D., Schur P.H. Influenza vaccine response in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1978; 88 (6): 735–740.
19. Louie J.S., Nies K.M., Shoji K.T., Fraback R.C., Abrass C., Border W. et al. Clinical and antibody responses after influenza immunization in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1978; 88 (6): 790–792.
20. Ristow S.C., Douglas R.G. Jr, Condemni J.J. Influenza vaccination of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1978; 88 (6): 786–789.
21. Herron A., Dettleff G., Hixon B., Brandwin L., Orbals D., Hornick R. et al. Influenza vaccination in patients with rheumatic diseases. Safety and efficacy. *JAMA* 1979; 242 (1): 53–56.
22. Holvast A., van Assen S., de Haan A., Huckriede A., Benne C.A., Westra J. et al. Studies of cell-mediated immune responses to influenza vaccination in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60 (8): 2438–2447.
23. Holvast A., van Assen S., de Haan A., Huckriede A., Benne C.A., Westra J. et al. Effect of a second, booster, influenza vaccination on antibody responses in quiescent systemic lupus erythematosus: an open, prospective, controlled study. *Rheumatology* 2009; 48 (10): 1294–1299.
24. Concept Paper on the Revision of the CPMP/ BWP Note for Guidance on Harmonization of Requirements for Influenza Vaccines (CPMP/ BWP/214/96)./London, 31 May, 2001/CPMP/EWP/1045/01.
25. Kostianovsky A., Charles P., Alves J.F., Goulet M., Pagnoux C., Le Guern V. et al. Immunogenicity and safety of seasonal and 2009 pandemic A/H1N1 influenza vaccines for patients with autoimmune diseases: a prospective, monocentre trial on 199 patients. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: 1: Suppl 70: S83–89.
26. Blumentals W.A., Arreglado A., Napalkov P., Toovey S. Rheumatoid arthritis and the incidence of influenza and influenza-related complications: a retrospective cohort study. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 13: 158.
27. Miraglia J.L., Abdala E., Hoff P.M., Luiz A.M., Oliveira D.S., Saad C.G. et al. Immunogenicity and reactogenicity of 2009 influenza A (H1N1) inactivated monovalent non-adjuvanted vaccine in elderly and immunocompromised patients. *PLoS One* 2011; 6 (11): e27214.
28. França I.L., Ribeiro A.C., Aikawa N.E., Saad C.G., Moraes J.C., Goldstein-Schainberg C. et al. TNF blockers show distinct patterns of immune response to the pandemic influenza A H1N1 vaccine in inflammatory arthritis patients. *Rheumatology* 2012; 51 (11): 2091–2098.
29. Kobie J.J., Zheng B., Bryk P., Barnes M., Ritchlin C.T., Tabechian D.A. et al. Decreased influenza-specific B cell responses in rheumatoid arthritis patients treated with anti-tumor necrosis factor. *Arthritis Res Ther* 2011; 13 (6): R209.
30. Elkayam O., Bashkin A., Mandelboim M., Litinsky I., Comaheshter D., Levartovsky D. et al. The effect of infliximab and timing of vaccination on the humoral response to influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39 (6): 442–447.
31. Kaine J.L., Kivitz A.J., Birbara C., Luo A.Y. Immune responses following administration of influenza and pneumococcal vaccines to patients with rheumatoid arthritis receiving adalimumab. *J Rheumatol* 2007; 34 (2): 272–279.
32. Kivitz A.J., Schechtman J., Texter M., Fichtner A., de Longueville M., Chartash E.K. Vaccine responses in patients with rheumatoid arthritis treated with certolizumab pegol: results from a single-blind randomized phase IV trial. *J Rheumatol* 2014; 41 (4): 648–657.
33. Park J.K., Lee M.A., Lee E.Y., Song Y.W., Choi Y., Winthrop K.L. et al. Effect of methotrexate discontinuation on efficacy of seasonal influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2017; 76 (9): 1559–1565.
34. Tsuru T., Terao K., Murakami M., Matsutani T., Suzaki M., Amamoto T. et al. Immune response to influenza vaccine and pneumococcal polysaccharide vaccine under IL-6 signal inhibition therapy with tocilizumab. *Mod Rheumatol* 2014; 24 (3): 511–516.
35. Ribeiro A.C., Laurindo I.M., Guedes L.K., Saad C.G., Moraes J.C., Silva C.A. et al. Abatacept and reduced immune response to pandemic 2009 influenza A/H1N1 vaccination in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2013; 65 (3): 476–480.
36. Genovese M.C., Bingham C.O., Cohen S., Calabrese L., Curtis J.R., Block A. et al. Antibody response to pneumococcal and influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis receiving subcutaneous abatacept. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 10: Suppl: 198.
37. van Assen S., Holvast A., Benne C.A., Posthumus M.D., van Leeuwen M.A., Voskuyl A.E. et al. Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Arthritis Rheum* 2010; 62 (1): 75–81.
38. Eisenberg R.A., Jawad A.F., Boyer J., Maurer K., McDonald K., Prak E.T. et al. Rituximab-treated patients have a poor response to influenza vaccination. *J Clin Immunol* 2013; 33 (2): 388–396.
39. Hua C., Barneche T., Combe B., Morel J. Effect of methotrexate, anti-tumor necrosis factor α , and rituximab on the immune response to influenza and pneumococcal vaccines in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res* 2014; 66 (7): 1016–1026.
40. Kapetanovic M.C., Kristensen L.E., Saxne T., Aktas T., Mørner A., Geborek P. et al. Impact of anti-rheumatic treatment on immunogenicity of pandemic H1N1 influenza vaccine in patients with arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014; 16 (1): R2.
41. Shinjo S.K., de Moraes J.C., Levy-Neto M., Aikawa N.E., de Medeiros Ribeiro A.C., Schahin Saad C.G. et al. Pandemic unadjuvanted influenza A (H1N1) vaccine in dermatomyositis and polymyositis: immunogenicity independent of therapy and no harmful effect in disease. *Vaccine* 2012; 31 (1): 202–206.
42. Setti M., Fenoglio D., Analdi F., Filaci G., Bacilieri S., Sticchi L. et al. Flu vaccination with a virosomal vaccine does not affect clinical course and immunological parameters in scleroderma patients. *Vaccine* 2009; 27 (25–26): 3367–3372.
43. Sampaio-Barros P.D., Andrade D.C.O., Seguro L.C.P., Pasoto S.G., Viana V.S.T., Ribeiro A.C.M. et al. Pandemic non-adjuvanted influenza A H1N1 vaccine in a cohort of patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2017 Sep 8. doi: 10.1093/rheumatology/kex330.
44. Wotton C.J., Goldacre M.J. Risk of invasive pneumococcal disease in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record linkage cohort analyses. *J Epidemiol Community Health* 2012; 66 (12): 1177–1181.
45. Koivuniemi R., Leirisalo-Repo M., Suomalainen R., Piirainen H., Paimela L. Infectious causes of death in patients with rheumatoid arthritis: an autopsy study. *Scand J Rheumatol* 2006; 35: 273–276.
46. Nossent J., Cices N., Kiss E., Marchesoni A., Nassanova V., Mosca M. et al. Current causes of death in systemic lupus erythematosus in Europe, 2000–2004: relation to disease activity and damage accrual. *Lupus* 2007; 16: 309–317.
47. Narata R., Wangkaew S., Kasitanon N., Louthrenoo W. Community-acquired pneumonia in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 3: 528–536.
48. Mercado U. Why have rheumatologists been reluctant to vaccinate patients with systemic lupus erythematosus? *J Rheumatol* 2006; 33 (8): 1469–1471.
49. Kapetanovic M.C., Saxne T., Sjöholm A., Truedsson L., Jönsson G., Geborek P. Influence of methotrexate, TNF blockers and prednisolone on antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45 (1): 106–111.
50. Bingham C.O. 3rd, Rizzo W., Kivitz A., Hassanali A., Upmanyu R., Kleiman M. Humoral immune response to vaccines in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: results of a randomised controlled trial (VISARA). *Ann Rheum Dis* 2015; 74 (5): 818–822.
51. Bingham C.O. 3rd, Looney R.J., Deodhar A., Halsey N., Greenwald M., Coddling C. et al. Immunization responses in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab: results from a controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 2010; 62 (1): 64–74.
52. Crnkic Kapetanovic M., Saxne T., Jönsson G., Truedsson L., Geborek P. Rituximab and abatacept but not tocilizumab impair antibody response to pneumococcal conjugate vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15 (5): R171.
53. Pham T., Claudepierre P., Constantin A., Fautrel B., Gossec L., Gottenberg J.E. et al. Abatacept therapy and safety management. *Joint Bone Spine* 2009; 76: Suppl 1: S3–S55.
54. Наумцева М.С., Белов Б.С., Александрова Е.Н., Тарасова Г.М., Новиков А.А., Каратеев Д.Е. и др. Иммуногенность и безопасность 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины у больных ревматоидным артритом: результаты двухлетнего наблюдения. Научно-практическая ревматология 2016; 54 (6): 674–680. / Naumceva M.S., Belov B.S., Aleksandrova E.N., Tarasova G.M., Novikov A.A., Karatev D.E. i dr. Immunogennost' i bezopasnost' 23-valentnoj polisakharidnoj pnevmo-kokkovoj vakciny u bol'nykh revmatoidnym artitrom: rezul'taty dvukhletnego na-bljudenija. Nauchno-prakticheskaja revmatologija 2016; 54 (6): 674–680. [in Russian]
55. Mercado U., Acosta H., Diaz-Molina R. Antibody response to pneumococcal polysaccharide vaccine in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009; 36 (7): 1549–1550.
56. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine for adults with immunocompromising conditions: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012; 61: 816–819.

57. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2015; 24. / Vakcinoprofilaktika pnevmokokkovej infekcii. Federal'nye klinicheskie reko-mendacii. M.: 2015; 24. [in Russian]
58. *Kapetanovich M., Nagel J., Nordström I., Saxne T., Geborek P., Rudin A.* Methotrexate reduces vaccine-specific immunoglobulin levels but not numbers of circulating antibody-producing B cells in rheumatoid arthritis after vaccination with a conjugate pneumococcal vaccine. *Vaccine* 2017; 35 (6): 903–908.
59. *Salinas G.F., De Rycke L., Barendregt B., Paramarta J.E., Hreggvidsdottir H., Cantaert T. et al.* Anti-TNF treatment blocks the induction of T cell-dependent humoral responses. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1037–1043.
60. *Migita K., Akeda Y., Akazawa M., Tohma S., Hirano F., Ideguchi H. et al.* Opsonic and Antibody Responses to Pneumococcal Polysaccharide in Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Golimumab Plus Methotrexate. *Medicine Baltimore* 2015; 94 (52): e21843.
61. *Grabar S., Groh M., Bahuaud M., Le Guern V., Costedoat-Chalumeau N., Mathian A. et al.* Pneumococcal vaccination in patients with systemic lupus erythematosus: A multicenter placebo-controlled randomized double-blind study. *Vaccine* 2017; 35 (37): 4877–4885.
62. *Curtis J.R., Yang S., Chen L., Winthrop K., Xie F., Baddley J.W., et al.* Herpes zoster infection across auto-immune and inflammatory diseases: implications for vaccination. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: Suppl 2: 452.
63. *Che H., Lukas C., Morel J., Combe B.* Risk of herpes/herpes zoster during anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. Systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2014; 81 (4): 379–380.
64. *Winthrop K.L., Curtis J.R., Lindsey S., Tanaka Y., Yamaoka K., Valdez H. et al.* Herpes Zoster and Tofacitinib: Clinical Outcomes and the Risk of Concomitant Therapy. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69 (10): 1960–1968.
65. *Guthridge J.M., Cogman A., Merrill J.T., Macwana S., Bean K.M., Powe T. et al.* Herpes zoster vaccination in SLE: a pilot study of immunogenicity. *J Rheumatol* 2013; 40 (11): 1875–1880.
66. *Zhang J., Xie F., Delzell E., Chen L., Winthrop K.L., Lewis J.D. et al.* Association between vaccination for herpes zoster and risk of herpes zoster infection among older patients with selected immune-mediated diseases. *JAMA* 2012; 308 (1): 43–49.
67. *Yun H., Xie F., Baddley J.W., Winthrop K., Saag K.G., Curtis J.R.* Long-term Effectiveness of Herpes Zoster Vaccine among Patients with Autoimmune and Inflammatory Diseases. *J Rheumatol* 2017; 44 (7): 1083–1087.
68. *Ferreira I., Isenberg D.* Vaccines and biologics. *Ann Rheum Dis*. 2014 Aug; 73 (8): 1446–1454.
69. *Chakravarty E.F.* Incidence and Prevention of Herpes Zoster Reactivation in Patients with Autoimmune Diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2017; 43 (1): 111–121.
70. *Klumb E.M., Pinto A.C., Jesus G.R., Araujo M. Jr., Jascone L., Gayer C.R. et al.* Are women with lupus at higher risk of HPV infection? *Lupus* 2010; 19 (13): 1485–1491.
71. *Lyrio L.D., Grassi M.F., Santana I.U., Olavarria V.G., Gomes Ado N. et al.* Prevalence of cervical human papillomavirus infection in women with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2013; 33 (2): 335–340.
72. *Mok C.C., Ho L.Y., Fong L.S., To C.H.* Immunogenicity and safety of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 (5): 659–664.
73. *Dhar J.P., Essenmacher L., Dhar R., Magee A., Ager J., Sokol R.J.* The safety and immunogenicity of Quadrivalent HPV (qHPV) vaccine in systemic lupus erythematosus. *Vaccine* 2017; 35 (20): 2642–2646.
74. *Moraes-Fontes M.F., Antunes A.M., Gruner H., Riso N.* Vaccination of Adult Patients with Systemic Lupus Erythematosus in Portugal. *Int J Rheumatol* 2016; 2016: 2845617.
75. *Mathian A., Arnaud L., Adoue D., Agard C., Bader-Meunier B., Baudouin V. et al.* Prevention of infections in adults and adolescents with systemic lupus erythematosus: Guidelines for the clinical practice based on the literature and expert opinion. *Rev Med Interne*. 2016; 37 (5): 307–320.
76. *Caporali R., Bobbio-Pallavicini F., Atzeni F., Sakellariou G., Caprioli M., Montecucco C. et al.* Safety of tumor necrosis factor alpha blockers in hepatitis B virus occult carriers (hepatitis B surface antigen negative/anti-hepatitis B core antigen positive) with rheumatic diseases. *Arthritis Care Res* 2010; 62 (6): 749–754.
77. *Tan J., Zhou J., Zhao P., Wei J.* Prospective study of HBV reactivation risk in rheumatoid arthritis patients who received conventional disease-modifying antirheumatic drugs. *Clin Rheumatol* 2012; 31 (8): 1169–1175.
78. *Elkayam O., Yaron M., Caspi D.* Safety and efficacy of vaccination against hepatitis B in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61 (7): 623–625.
79. *Alvarez M.M., Fernandes C.G., Exposito A.G.* Antibody response to the standard hepatitis B vaccination in patients with rheumatoid arthritis an ankylosing spondylitis treated with infliximab. *Arthritis Rheum* 2011; 63 (10): Suppl 1: 515.

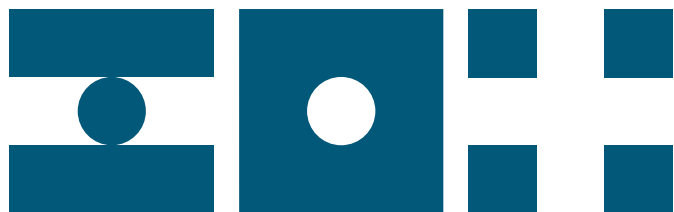
СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Борис Сергеевич Белов — д. м. н., зав. лабораторией изучения роли инфекций при ревматических заболеваниях, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва

Дарья Валерьевна Буханова — аспирант лаборатории изучения роли инфекций при ревматических заболеваниях,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва

Галина Михайловна Тарасова — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории изучения роли инфекций при ревматических заболеваниях, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва



Цитофлавин

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ
ВНУТРИВЕННО КАПЕЛЬНО

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ
ВНУТРЬ

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ
СРЕДСТВО

ГАРМОНИЧНАЯ НЕЙРОПРОТЕКТИВНАЯ КОМПОЗИЦИЯ

- Оригинальный препарат с мультифакторным антигипоксическим, антиоксидантным действием и выраженной энергокоррекцией клетки
- Позволяет осуществлять удобную ступенчатую терапию
- Производится в соответствии с европейскими стандартами качества

Per. № ЛС-001767 от 13.09.2011
Per. № Р-003135/01 от 21.11.2008
Реклама



ООО «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФИРМА «ПОЛИСАН»
INFO@POLYSAN.RU WWW.POLYSAN.RU

РОССИЯ, 192102, Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ,
УЛ. САЛОВА, Д. 72, КОР. 2, ЛИТ. А,
ТЕЛ.: +7 (812) 710-82-25

Интеллект на защите
здоровья
polysan