

И.В. Сарвилина¹, М.Г. Романцов²

¹ Медицинский центр «Новомедицина», Ростов-на-Дону

² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Протеомный профиль и неспецифическая иммунопрофилактика респираторных заболеваний у часто болеющих детей

Проведена оценка эффективности применения меглюмина акридоната (Циклоферона) у часто болеющих детей (ЧБД) на основе динамики протеомного профиля плазмы крови; изучена эпидемиологическая эффективность индуктора интерферона как средства неспецифической иммунопрофилактики. Наблюдали ЧБД в возрасте от 4 до 10 лет. Применяли рекомендованные схемы введения препарата. Проанализирован анамнез ЧБД, клиническая симптоматика, расчет инфекционного индекса, включение детей в одну из 5 групп ЧБД и выделение типов истинно болеющих повторными ОРЗ. По результатам оценки протеомных методов исследования плазмы крови выявлены чувствительные параметры, позволяющие оценить эффективность лечения меглюмина акридонатом, к которым отнесены интенсивность экспрессии белков Rho- и Ras-сигнальных путей в крови. Эпидемиологическая эффективность препарата составила 2,9 (от 2,4 до 3,4), показатель защиты — 62,8% (от 58,5 до 67,1%).

Ключевые слова: меглюмина акридонат, протеомный профиль крови, часто болеющие дети.

Введение

Проблемы выявления часто болеющих детей (ЧБД), их диспансеризации, а также разработки, оценки безопасности и эффективности новых технологий медикаментозной профилактики сохраняют свою актуальность. Сложность диагностики, профилактики и лечения ЧБД определяется онтогенетическими особенностями возраста ребенка; дисбалансом в работе нейроиммуноэндокринных сетевых взаимодействий; нарушением микробиоценоза носоглотки, дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта; нерациональным назначением антибиотиков и иммуностропных лекарственных средств, а также наличием более 200 инфекционных агентов, вызывающих острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) и вирусно-бактериальные ассоциации [1–4].

У ЧБД вследствие длительного и массивного антигенного воздействия на организм формируется иммунокомплексная патология, ключевым звеном в возникновении которой служит недостаточность резервных воз-

можностей синтеза интерферона, требуя в свою очередь системного подхода в формировании режимов медикаментозной профилактики. Перспективным классом лекарственных средств для неспецифической иммунопрофилактики являются интерферогены — вещества природного и/или синтетического происхождения, способные вызывать образование эндогенного интерферона в определенных популяциях клеток организма пациента. Препараты не требуют многократного введения, не обладают антигенностью, при этом у них отсутствуют побочные эффекты, характерные для препаратов экзогенного интерферона; они хорошо сочетаются с антибиотиками, иммуномодуляторами. Среди интерферогенов по безопасности и эффективности выделяется меглюмина акридонат (Циклоферон) — зарекомендовавший себя низкомолекулярный индуктор раннего синтеза α -, β - и γ -интерферонов с широким диапазоном фармакологических эффектов за счет запуска каскада биомолекулярных сигналов, восстанавливающих «цитокинную сеть» в организме [5].

I.V. Sarvilina¹, M.G. Romantsov²

¹ Medical centre «Novomeditsina», Rostov-on-Don

² Metchnikov North-western state medical university, St. Petersburg

Proteomic profile and non-specific immunoprophylaxis of respiratory diseases in frequently sick children

We have investigated efficacy of meglumine acridonacetate (Cycloferon) in frequently sick children (FSC) on the basis of serum proteomic profile dynamics; we have also studied epidemiologic efficacy of interferon inductor as a mean of non-specific immunoprophylaxis. FSC were subjects to follow up during 4–10 years. We have used recommended regimens of drug administration. Were analyzed: anamneses of FSC, clinical symptoms, infectious index calculation, stratification of children into 5 groups of FSC and separation of children with truly frequent recurrent respiratory viral diseases. On the basis of proteomic blood analyzes the following parameters of efficacy of treatment with meglumine acridonacetate were defined: expression intensity of Rho- and Ras-signaling pathways proteins. Epidemiologic efficacy of the drug was 2,9 (from 2,4 to 3,4), rate of protection — 62,8% (58,5–67,1%).

Key words: meglumine acridonacetate, proteomic blood profile, frequently sick children.

ЦИКЛОФЕРОН®

мы создаем
УНИКАЛЬНОЕ



НТФФ
"ПОЛИСАН"

www.polysan.ru



ЩИТ И МЕЧ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ

- Первый российский низкомолекулярный индуктор интерферона
- Оригинальный механизм фармакологического действия
- Безопасность, надежность и доказанная эффективность
- Идеальная совместимость
- Производится в соответствии с международным стандартом качества GMP

Показания к применению:

Таблетки

(Reg№ 001049/02):
вирусные инфекции
(грипп, ОРЗ, гепатиты, герпес),
кишечные инфекции,
нейроинфекции

Инъекции

(Reg№ 001049/03):
вирусные инфекции,
заболевания передаваемые
половым путем, кишечные
инфекции, нейроинфекции

Линимент

(Reg№ 001049/01):
уретриты, баланопоститы,
вагиниты, стоматиты,
пародонтиты



Форма выпуска: раствор для инъекций
125 мг/мл в ампулах по 2 мл №5;
таблетки по 150 мг, покрытые
кишечнорастворимой оболочкой;
линимент 5% тубы по 5 мл и 30 мл

Целью представленного исследования стала оценка эффективности применения меглюмина акридоната у ЧБД на основе динамики протеомного профиля плазмы крови. В соответствии с поставленной целью сформированы следующие задачи:

1. Проведение масс-спектрального анализа основных белков плазмы крови — биомаркеров прогрессирования иммунокомплексной патологии у ЧБД на фоне рекомендованного приема апробируемого препарата в таблетках.

2. Выявление новых чувствительных и специфичных параметров оценки эффективности и безопасности применения препарата в популяции ЧБД.

3. Оценка эпидемиологической эффективности препарата в таблетках с целью неспецифической иммунопрофилактики у часто болеющих детей в период сезонного подъема респираторной заболеваемости.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 37 ЧБД в возрасте от 4 до 10 лет, из них мальчиков — 21 и девочек — 16 (табл. 1). Контрольную группу составили 12 здоровых детей в возрасте от 4 до 10 лет. Рандомизация осуществлялась с использованием метода «конвертов». Продолжительность наблюдения за эффективностью меглюмина акридоната составила 12 месяцев. Дети, включенные в исследование, относились к категории «истинно» ЧБД. Препарат применялся по схеме, указанной в инструкции по медицинскому применению, из расчета 10 мг/кг массы тела: детям до 7 лет — по 300 мг (2 таблетки) на 1, 2, 4, 6, 8-й дни и далее с интервалом 72 ч еще 5 приемов; детям старше 7 лет — по 600 мг на 1, 2, 4, 6, 8-й дни и далее через 72 ч по 300 мг еще 5 приемов. Пациенты не принимали других лекарственных препаратов.

Анализ результатов исследования включал использование информационно-диагностического компьютерного программного комплекса «Файл пациента». Учитывался анамнез, анализировалась клиническая симптоматика, рассчитывался инфекционный индекс (отношение суммы всех случаев ОРЗ в течение года к возрасту ребенка). Определялась принадлежность ребенка к одной из 5 групп ЧБД и одному из 3 основных клинических типов истинно ЧБД, а также учитывались данные электрофоретического и масс-спектрометрического исследования плазмы крови до- и на фоне приема апробируемого препарата для оценки его эффективности и безопасности с учетом сопутствующего лечения [2, 6].

Выделение отдельных белков плазмы крови у детей производилось на основе префракционирования плазмы крови с использованием метода изоэлектрофокусировки с помощью комплекта «MicroRotofor Liquid-Phase IEF Cell» (BioRad, Франция) и последующего двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (2DPAGE, BioRad, Франция). Относительную электрофоретическую подвижность (Rf) определяли как отношение подвижности вещества к подвижности зоны фореза ($Rf = u_l / u_f$); для определения молекулярной массы (Mг) белка сравнивали его подвижность с известной Mг. Получение масс-спектрограмм пептидных фрагментов и белков выполняли на основе времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией при содействии матрицы (MALDI-TOF-масс-спектрометрия). Приготовление образцов выполняли методом сухой капли с использованием 2 мкл раствора HCCA — для пептидов и 0,5 мкл раствора 2,5-DHB (2,5-дигидроксibenзойная кислота) — для белков.

Таблица 1. Клинико-anamнестическая характеристика целевой популяции часто болеющих детей

Показатель	Целевая популяция (выборка)
Пол (мальчики/девочки)	21/16
Возраст, годы	6,2±3,0
Инфекционный индекс	2,3±0,6
Группы ЧБД:	
1 группа	22
2 группа	—
3 группа	15
4 группа	—
5 группа	—
Клинические типы истинно ЧБД:	
— соматический тип	—
— оториноларингологический тип	10
— смешанный тип	27

Автоматизированный анализ MALDI-TOF-масс-спектрограммы с идентификацией специфических белков — биомаркеров развития гипотиреоза производился с помощью системы компьютерных программ, включающих «FlexControl/BioTools 2.1. / MASCOT» (Bruker Daltonics, США). Идентификацию и анализ аминокислотной последовательности пептидов и белков проводили с помощью поисковой системы «Mascot Search» в интегрированных базах данных NCBI, SwissProt, MSDB (масс-фингерпринт). Интенсивность каждого пептидного фрагмента и белка оценивалась на основе программы «PDQuest» (Bio-Rad, США).

Кроме этого, проведен анализ эпидемиологической эффективности применения меглюмина акридоната у 850 часто болеющих детей в возрасте старше 4 лет в период сезонного подъема заболеваемости.

Статистическую обработку материала исследования проводили с использованием пакета статистических программ для биомедицинских исследований «Statistica 6.0» с использованием параметрических и непараметрических критериев. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Назначение Циклоферона в соответствии с рекомендованным режимом приема сопровождалось снижением частоты ОРЗ (с 4,9 до 1,2 раза), длительности обострения (с 7,2 до 4,3 дней), минимизацией проявлений аллергического компонента (с 62,1 до 13,5%) у ЧБД, отнесенных к 1-й группе. У ЧБД со смешанным клиническим типом выявлено снижение уровня тревожности, количества отрицательных эмоций, нарушений сна, аппетита, симптомов двигательной расторможенности.

Анализ результатов MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа пептидов и белков плазмы крови в утреннее время суток у ЧБД обнаружил различия в качественном составе и интенсивности белков — маркеров прогрессирования иммунокомплексной патологии до назначения и на фоне приема препарата (табл. 2, рис. 1).

В условиях таксономического поиска в режиме «Mascot Search» в ряду вирусов, бактерий и грибов обнаружена динамика интенсивности структурных и функциональных белков микроорганизмов в плазме крови на фоне приема апробируемого препарата (табл. 3).

Таблица 2. Протеомный профиль плазмы крови контрольной и исследуемой групп детей

Название белка/Mr (Da)	Контрольная группа (n=12)	ЧБД (n=37) (M±SEM)	
		Исходно	Через 1 месяц
Белок Ras-системы, семейство малых ГТФаз / 28593	1,32±0,03	1,22±0,02 1)***2)***	1,27±0,01 3)**4)**
Белок, регулирующий Rho-ГТФазную систему / 132525	0,29±0,03	0,16±0,02 1)***2)***	0,21±0,03 3)**4)**
Aging-associated protein 2/41305	—	0,11±0,02	0,05±0,01 3)**4)**
Aging-associated protein 14b/28348	—	0,72±0,2	0,54±0,9 3)***4)***

Примечание.* — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001.

- 1) вероятность по t-критерию Стьюдента между группами пациентов контрольная/исследуемая до назначения лечения;
- 2) вероятность по U-критерию Уитни между группами пациентов контрольная/исследуемая до назначения лечения;
- 3) вероятность по t-критерию Стьюдента в группе пациентов исследуемая до назначения лечения/ через 1 месяц лечения;
- 4) вероятность по U-критерию Уитни в группе пациентов исследуемая до назначения лечения/ через 1 месяц лечения.

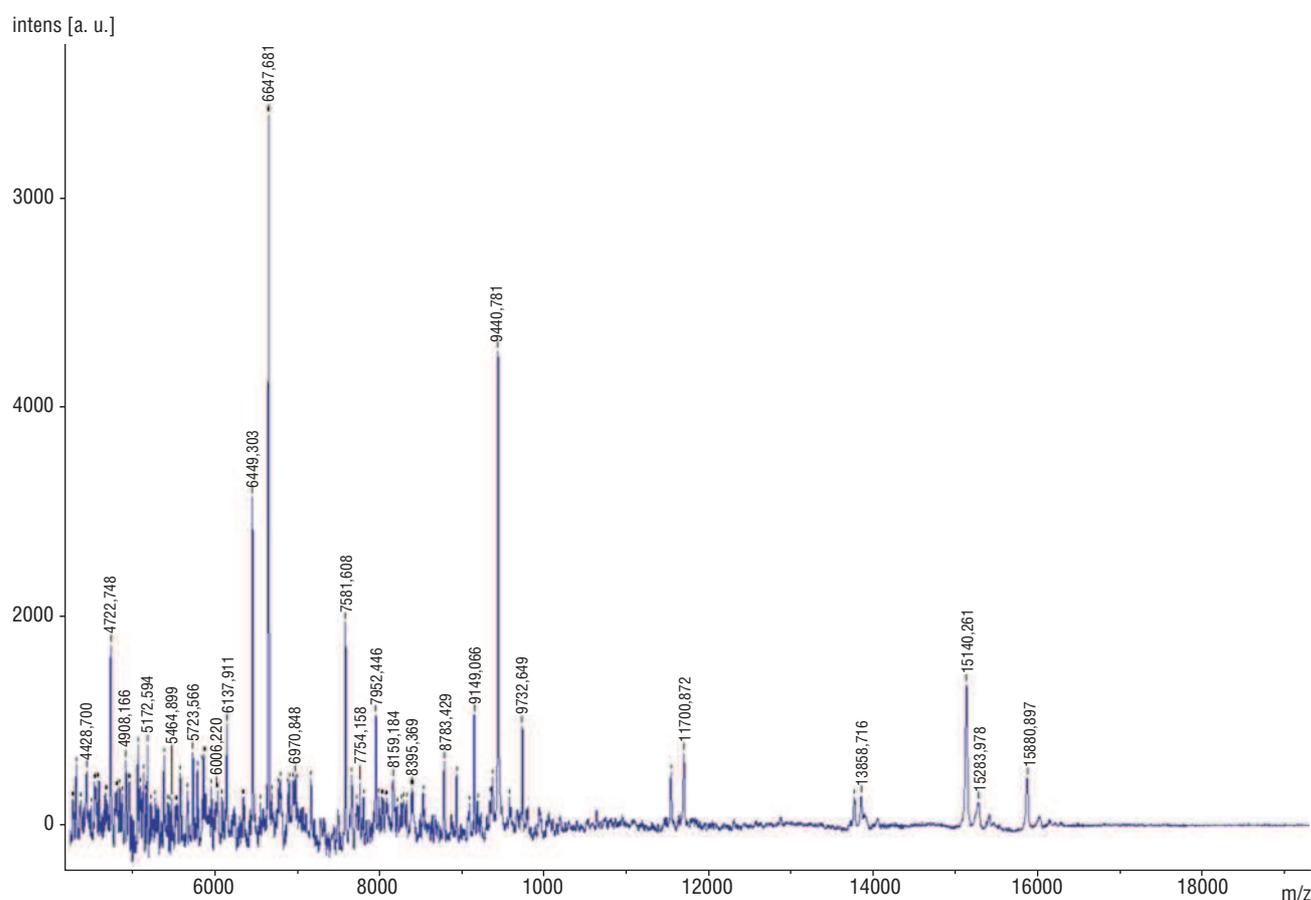


Рис. 1. Пример масс-спектрограммы пептидных фрагментов и белков плазмы крови ребенка в возрасте 6 лет исследуемой группы (диапазон Mr =4–16 кДа)

Таблица 3. Профиль белковых маркеров микроорганизмов в плазме крови контрольной и исследуемой групп детей

Название белка/ Mr (Da)	Контрольная группа (n=12)	ЧБД (n=37) (M±SEM)	
		Исходно	Через 1 месяц
L-фукулозофосфат альдолаза — <i>Streptococcus pneumoniae</i> / 24351	-	1,25±0,02	0,14±0,04 1)* 2)*
SpOв-связанный ГТФ-связывающий белок — <i>Mycoplasma capricolum</i> / 48263	-	0,16±0,02	0,07±0,03 1)**2)**
Липопротеин D — <i>Mycoplasma pulmonis</i> / 37508	-	0,32±0,01	0,2±0,02 1)**2)**
UL130 — <i>Human herpesvirus 5</i> / 24765	-	0,23±0,03	-
ORF54 — <i>Human herpesvirus 8</i> / 33167	-	0,18±0,02	-
Белок B13N20.160 — <i>Neurospora crassa</i> / 14932	-	0,17±0,04	0,12±0,03 1)2)´
Эндопептидаза — <i>Cryptococcus neoformans</i> / 44115	-	0,2±0,08	0,21±0,07 1)2)´

Примечание. ` — недостоверные различия; * — p<0,05; ** — p<0,01.

- 1) вероятность по t-критерию Стьюдента в группе пациентов исследуемая до назначения лечения/ через 1 месяц лечения;
- 2) вероятность по U-критерию Уитни в группе пациентов исследуемая до назначения лечения/ через 1 месяц лечения.

Охарактеризуем механизм действия меглюмина акридоацетата на основе полученных данных о молекулярных эффектах на уровне протеома плазмы крови ЧБД. Обнаруженное увеличение активности ключевых компонентов Ras- (rat sarcoma) и Rho (ras-like proteins)-сигнального пути (белок Ras-системы, семейство малых гуанозинтрифосфатаз; белок, регулирующий Rho-ГТФазную систему) в группе ЧБД на фоне назначения препарата указывает на эффективную работу интерферона- γ , активирующего Rho-ГТФазную и Ras-систему, контролируя противовирусное действие меглюмина акридоацетата. Одновременно снижается уровень индуцибельной синтазы оксида азота, активирующейся в респираторном эпителии при наличии вирусно-бактериальных ассоциаций, уменьшая высвобождение лизофосфотидиевой кислоты из эпителиальных клеток, тромбоцитов и фибробластов с последующей минимизацией повреждения клеток бронхоальвеолярного тракта. Активность препарата в отношении вирусно-бактериальных ассоциаций отразилась в отсутствии белков — маркеров вирусов (*Human herpesvirus 5*, *Human herpesvirus 8*) и уменьшении ($p < 0,05$) в течение 1 месяца белков — маркеров бактериальной (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma pulmonis*) и грибковой инфекций (*Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*), выявленных у ЧБД до назначения лекарственного препарата.

Уменьшение интенсивности белка 2 (aging-associated protein 2) и параллельное увеличение интенсивности белка 14b, связанных со старением (aging-associated protein 14b), в плазме крови ЧБД на фоне приема препарата отражает реставрацию активности пероксисомальных мембранных переносчиков на уровне клеток иммунной системы и трахеобронхиального дерева при наибольшей экспрессии этих белков у здоровых лиц.

Следовательно, меглюмина акридоацетат оказывает иммунокорректирующее действие, молекулярные основы которого связаны, в частности, с работой Rho- и Ras-сигнальных путей в клетках органов-мишеней.

Показана высокая эпидемиологическая эффективность препарата (индекс эффективности 2,9 при колебаниях от 2,4 до 3,4 при показателе защиты от 58,5 до 67,1%), снижение (в 2,9 раза) заболеваемости ОРЗ [7].

У больных ОРЗ, осложненной лакунарной ангиной, нормализация температуры (в первые 48 ч) отмечена у 88% больных против 24%, получавших антибиотики. Отмечали снижение (в 2,4–4,4 раза) заболеваемости ОРЗ (при использовании меглюмина акридоацетат) как у детей, так и у подростков. Наблюдалась смена структуры ОРЗ среди заболевших, увеличивались легкие формы заболеваний, уменьшались тяжелые и осложненные (в 4,3 и более раза), подтвердив клиническую эффективность экономическим критерием «затраты-эффективность» [8].

Наблюдалось уменьшение (в 1,4 раза) числа обострений бронхиальной астмы и частоты ОРВИ (в 2 раза) у детей, больных бронхиальной астмой. Содержание IFN-g коррелирует со степенью тяжести аллергической патологии, отмечено повышение чувствительности клеток к кортикостероидам в его присутствии. Эффект от терапии меглюмина акридоацетатом бронхиальной астмы составил 71% и сохранялся в течение полугода после окончания терапии [9].

В исследовании М.В. Гарашенко общее число заболевших среди получавших апробируемый препарат составило 6%, у всех наблюдалось легкое течение ОРЗ; число пропущенных дней по болезни в пересчете на 1 ребенка

составило 4,8 дня. Среди детей, не получавших средств неспецифической профилактики, уровень заболеваемости составил 58%, у детей, получавших Гриппол, — 19% [10]. Применяя меглюмина акридоацетат для профилактики ОРЗ и гриппа, Е.И. Кондратьева отмечала снижение интоксикации, выраженности и продолжительности катаральных явлений со стороны верхних дыхательных путей. Автором показан цитопротективный эффект на слизистую оболочку полости носа, заключающийся в снижении степени деструкции плоского и цилиндрического эпителия, в повышении содержания лизоцима на фоне увеличения уровня секреторного компонента иммуноглобулина А в ротоглоточном секрете, при этом защитное действие препарата сохранялось в течение 6 месяцев [11].

В наших исследованиях использован Циклоферон в сезон подъема заболеваемости ОРЗ 2009–2010 гг. у 150 подростков, находившихся в организованном коллективе; показатель заболеваемости колебался от 43,4 до 76,7 на 10 тыс. населения, превышая в 2 раза среднееголетний уровень. Циркулировал вирус гриппа А (H1N1)/09 и H3N2, документированный по обращаемости, соответственно, у 14 и 4% обследованных больных на фоне циркуляции вируса парагриппа (11%), адено- и РС-вирусов (4%), указывая на наличие смешанной циркуляции респираторных вирусов. Основанием для выбора Циклоферона явилось проведенное нами изучение его противовирусной активности в отношении вирусов гриппа А различного происхождения в эксперименте *in vivo* на животных. Так, индекс защиты с использованием апробируемого препарата колебался от 35 до 41%, а среди животных, получавших осельтамивир (Тамифлю), — 36,1%. У наблюдаемых больных ОРЗ и гриппом отмечался синдром интоксикации, выраженный в первые 2 дня заболевания, усиление катарального синдрома — на 3-и сутки наблюдения. Длительность синдромов сохранялась не более 5 дней. Второй пик лихорадки отмечен у 38,1% больных на 3-й день заболевания. По клиническим проявлениям поражение дыхательных путей (сезон эпидемического подъема респираторной заболеваемости 2009–2010 гг.) носило характер смешанной (вирусно-вирусной) микст-инфекции, чем и объясняется второй пик температурной реакции. Ее нормализация установлена на 4-й день наблюдения. Циклоферон при своевременно начатом лечении обеспечивает минимизацию синдрома интоксикации, катарального синдрома. Нормализация температурной реакции наступает к 4-му приему препарата без использования антибактериальных средств [12].

Выводы

1. Показана динамика качественного состава и интенсивности молекулярных маркеров прогрессирования иммунокомплексной патологии в плазме крови ЧБД на фоне приема меглюмина акридоацетата, увеличивающаяся интенсивность компонентов Rho- и Ras-сигнальных путей при значимом уменьшении интенсивности белков старения.

2. Чувствительными и специфичными параметрами оценки эффективности режимов неспецифической иммунопрофилактики ЧБД являются показатели интенсивности белков Rho- и Ras-сигнальных путей в протеомном профиле крови.

3. Используемые в работе протеомные технологии исследования плазмы крови ЧБД на фоне приема имму-

нотропных лекарственных средств позволяют оценить эффективность и безопасность применения препарата с учетом установления перспективных мишеней для разработки новых средств медикаментозной иммунопрофилактики у часто болеющих детей.

4. Установлена высокая эпидемиологическая эффективность меглюмина акридоната (индекс эффективности 2,9 при колебаниях от 2,4 до 3,4, при показателе

защиты от 58,5 до 67,1%), снижение (в 2,9 раза) заболеваемости ОРЗ. Показана смена структуры ОРЗ среди заболевших, увеличение легких форм заболеваний, уменьшение тяжелых и осложненных (в 4,3 и более раза), подтвердив клиническую эффективность экономическим критерием «затраты-эффективность». Наблюдали уменьшение (в 1,4 раза) числа обострений и частоты ОРЗ (в 2 раза) у детей, больных бронхиальной астмой.

REFERENCES

1. Romantsov M.G. Chasto boleyushchie deti: sovremennaya farmakoterapiya. *Moskva*. 2009. 349 s.
2. Makarova Z.S., Golubeva L.S. Ozdorovlenie i reabilitatsiya chasto boleyushchikh detei. *Moskva*. 2004. 321 s.
3. Samsygina G.A. Chasto boleyushchie deti: problemy patogeneza, diagnostiki i terapii. *Pediatrics*. 2005; 1: 66–74.
4. Voevodin D. A. Disbakterioz i immunopatologicheskii protsess. *Zhurn. mikrobiol.* 2005; 2: 89–92.
5. Diagnostika, differentsial'naya diagnostika i lechenie detskikh infektsii / pod red. V.M. Timchenko, V.V. Levanovicha, I.B. Mikhailova. *SPb.*, 2004. 430 s.
6. Romantsov M.G. Respiratornye zabolevaniya u detei. *Moskva*. 2003. 137 s.
7. Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferony i ikh induktory (ot molekul do lekarstv). *Moskva*. 2005. 340 s.
8. Ershov F.I., Romantsov M.G. Antivirusnye sredstva v pediatrii. *Moskva*. 2005. 243 s.
9. Gorshkova Yu.V., Tregubov A.V., Sarvilina I.V. Programmnyi produkt «Registratsiya pobochnykh reaktsii na lekarstvennyye preparaty». *Biomeditsina*. 2006; 3: 121–122.
10. Garashchenko M.V. Novye tekhnologii v medikamentoznoi profilaktike ORZ u detei shkol'nogo vozrasta v usloviyakh megapolisa. *Avtoref. dis. ...kand. med. nauk. Moskva*. 2007. 21 s.
11. Kondrat'eva E.I. Ekstrennaya nespetsificheskaya profilaktika ORVI i grippa preparatom tsikloferon u detei v epidemicheskii period. *Vestnik Sankt-Peterburgskoi gosudarstvennoi meditsinskoi akademii im. I.I. Mechnikova*. 2009; 1: 148–153.
12. Shul'dyakova O.G. Kliniko-immunologicheskaya i profilakticheskaya effektivnost' tsikloferona v otnoshenii ORVI v organizovannykh kollektivakh. *Avtoref. dis. ...kand. med. nauk. Saratov*. 2007. 23 s.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Сарвилкина Ирина Владиславовна, директор медицинского центра «Новомедицина», доктор медицинских наук

Адрес: 344007, Ростов-на-Дону, ул. Социалистическая, д. 74

Тел.: (903) 436-48-66

E-mail: isarvilina@mail.ru

Романцов Михаил Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры педиатрии и детской кардиологии ГОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»

Адрес: 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, д. 47

Тел.: (921) 967-69-48

E-mail: mr@nextnail.ru