**Композиция трех мурамилпептидов грамотрицательных бактерий в иммунотерапии хронической пиодермии**

**Введение**

Пиодремии – зонтичный термин, объединяющий различающиеся по глубине поражения и клиническим проявлениям гнойно-воспалительные болезни кожи, течение которых зависит, с одной стороны, от свойств инфекционных агентов, с другой – от адекватности/эффективности иммунного ответа зараженного макроорганизма. Наиболее часто в качестве возбудителей пиодермии выступают представители родов *Staphylococcus* (*S. aureus*, реже – *S. epidermidis*) *и Streptococcus* (S. *pyogenes)*. Эти бактерии привлекают к себе внимание не только как причина разнообразных, в том числе инвазивных, инфекционных болезней, но и как микроорганизмы, которые способны индуцировать и/или потенцировать дефекты различных звеньев противоинфекционной защиты. По многим направлениям выигрывая эволюционную гонку вооружений с совершенствующейся системой защитных реакций хозяина, стафилококки и стрептококки научились уклоняться как от адаптивных, так и от врожденных иммунных механизмов [17]. *S. aureus* индуцирует целый ряд биохимических каскадов, в частности связанных с продукцией стафопаина В, вызывающих быструю апоптозоподобную гибель моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов [20]. *S. pyogenes* блокирует слияние фагосом с лизосомами в макрофагах, превращая эти клетки в резервуар для выживания и плацдарм для заражения новых клеток [13]. Кроме того, представители родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* манипулируют естественными механизмами иммунодемпфирования (т.е. подавления избыточных иммунных реакций), связывая рецепторы с внутриклеточным ингибирующим мотивом ITIM, и тем самым угнетая врожденные защитные механизмы макроорганизма [21]. Ключевыми чертами указанных бактерий является способность длительно колонизировать различные биотопы организма хозяина и вызывать рецидивирующие инфекции кожи и мягких тканей, не приводящие к формированию эффективной иммунной памяти и устойчивости к повторным заболеваниям.

В этой связи не вызывает сомнений востребованность иммуномодуляции как составной части комплексного лечения больных хроническими формами пиодермии, что актуализируют рациональный выбор эффективных средств восстановления антибактериальной защиты в коже и подкожной клетчатке.

В последнее 10-15 лет достаточно много работ было посвящено изучению роли цитозольных NOD-подобных рецепторов во врожденном иммунном ответе [16], а модуляция NOD1- и NOD2-зависимых сигналов рассматривается как одна из перспективных стратегий в лечении целого ряда инфекционных заболеваний человека [3, 8]. NOD1 и NOD2 экспрессируются многими клетками, локализующимися в коже и подкожной клетчатке, в том числе моноцитами/макрофагами и дендритными клетками [10]. Кератиноциты человека, являющиеся ключевыми клетками врожденного иммунного ответа против *S. aureus* в коже [7], также экспрессируют NOD1 [12] и NOD2 [14].

Нейтрофилы человека экспрессируют NOD2, но не NOD1 [11]. Вместе с тем NOD1-агонисты, индуцируя выработку хемокинов, опосредованно мобилизуют нейтрофилы в зоны бактериальной инвазии [15].

Доказано участие NOD2-зависимых сигналов во врожденной защите от стафилококкового поражения кожи [19] и заживлении кожных ран [8].

Вышесказанное предопределило выбор иммуномодулятора Полимурамила как средства иммунотерапии хронической рецидивирующей пиодермии. Он представляет собой стандартизованную композицию трех природных мурамилпептидных фрагментов пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которые являются агонистами NOD1 и NOD2 [9]. Показания к клиническому применению этого препарата включают различные формы пиодермии и вторичные иммунодефицитные состояния, проявляющиеся инфекционно-воспалительными хроническими и рецидивирующими процессами кожи.

Недавно завершено пострегистрационное исследование по оценке клинической и иммуномодулирующей активности Полимурамила у больных хронической рецидивирующей пиодермией. Предварительные данные этой работы опубликованы [4]. Вместе с тем целый ряд клинических и, особенно, иммунологических показателей остались за рамками указанной статьи.

Цель настоящей работы – представить окончательные, ранее не опубликованные данные исследования клинико-иммунологической эффективности Полимурамила у больных с хронической рецидивирующей пиодермией с акцентом на системные иммунологические показатели.

**Материал и методы исследования**

Исследование проведено как открытое двухцентровое рандомизированное испытание. У всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

Клиническими базами исследования являлись Многопрофильная профессорская клиника СитиМед центра ООО «Экология Здоровья» (г. Челябинск) и ГБУЗ «Челябинский областной клинический кожно-венерологический диспансер» (г. Челябинск).

Лабораторные исследования выполнены в клинико-диагностической лаборатории Многопрофильной профессорской клиники СитиМед центра ООО «Экология Здоровья» (г. Челябинск) и Центральной научно­исследовательской лаборатории ФГБУ ВО «Южно­Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Челябинск).

Полимурамил предоставлен для исследования ООО «Корус Фарм» в виде ампул по 0,5 мл, содержащих 200 мкг стандартизованной композиции трех мурамилпептидов, полученных из пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

В исследование включено 35 мужчин в возрасте 32 [27-40; 22-62] года с обострением хронической рецидивирующей пиодермии (остиофолликулит, фолликулит, сикоз, фурункулёз).

Критерии включения, невключения и исключения описаны ранее [4].

Распределение больных по группам проводилось случайным образом:

1) группа сравнения (17 человек), в которой пациенты получали стандартную терапию, включающую топические антибактериальные (фузидовая кислота в форме 2-процентного крема или мази наружно на область высыпаний 3-4 раза в сутки в течение 7-14 дней) и антисептические средства (фукорцин наружно на область высыпаний 3-4 раза в сутки в течение 7–14 дней) и, а при необходимости (при распространенном процессе и/или поражении лица) – системно действующие антибактериальные препараты (доксициклина моногидрат 100 мг перорально 2 раза в сутки в течение 10 дней);

2) основная группа (18 человек), в которой больные в дополнение к стандартной терапии, описанной выше, получали внутримышечно Полимурамил по 200 мг ежедневно в течение 5 суток (1-й – 5-й дни исследования).

 За 1 день до начала лечения (0-й день) у всех включенных в исследование больных собирали полный медицинский анамнез; осуществляли физикальный осмотр с фотофиксацией и дерматоскопией, клинический анализ крови, посев из фурункула (при возможности взятия материала).

Каждый день с 0-го по 7-й день, затем на 14-е сутки, через 1 и 6 месяцев исследования оценивали клинические симптомы пиодермии, в том числе подсчитывали число пустул/фурункулов в стадии нагноения и инфильтрации.

***Критерии общей оценки клинической эффективности***

Клинические результаты проводимого лечения на 14-й день, через 1 и 6 месяцев исследования оценивали как «значительное улучшение», «улучшение», «без эффекта» в соответствии с критериями, детально описанными ранее [4]. Кратко, значительным улучшением считали индукцию и сохранение полной клинической ремиссии; улучшением – индукцию и сохранение частичной ремиссии; без эффекта – сохраняющиеся признаки воспалительного процесса и отсутствие ремиссии.

***Методы иммунологических исследований***

Образцы крови для изучения иммунологических показателей отбирали на 0-й и 14-й день, через 1 и 6 месяцев исследования.

Функциональную активность нейтрофилов периферической крови определяли по их способности поглощать частицы латекса с вычислением фагоцитарного индекса (доли активно фагоцитирующих нейтрофилов) и фагоцитарного числа (среднего числа поглощенных микросфер латекса одним фагоцитом) [1].

Способность нейтрофилов к кислородзависимому киллингу определяли в тестах по спонтанному и индуцированному восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) [5].

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитофлуорометрии [6] с помощью цитометра «FС 500 Cytomics» и двух-четырех-параметрических реагентов линии IQ Test производства компании Beckman Coulter.

Уровень иммуноглобулинов А, G и М определяли турбидиметрическим методом с использованием реагентов фирмы «Human» согласно инструкции производителя.

Условной нормой иммунологических показателей считали референсные значения, принятые в клинико-диагностической лаборатории Многопрофильной профессорской клиники СитиМед центра ООО «Экология Здоровья» (г. Челябинск).

***Статистическая обработка результатов***

Полученные данные обработаны в программе Statistica 10 (StatSoft, США). Количественные характеристики представлены в тексте и таблицах в виде «Медиана [25-й – 75-й процентили; минимум – максимум]». Значимость отличий количественных показателей независимых выборок определяли с помощью *U*-критерия Манна-Уитни, зависимых выборок – критерия Уилкоксона. Значимость отличий независимых выборок по качественным признакам оценивали с помощью точного критерия Фишера, зависимых выборок – критерия МакНемара. Статистически значимыми считали отличия при p<0,05. При 0,05≤p<0,1 констатировали статистическую тенденцию к различию выборок.

**Результаты и обсуждение**

Рандомизация привела к формированию вполне сопоставимых выборок больных. Так, не выявлено математически подтвержденных отличий между группой сравнения и основной группой по возрасту (соответственно 31 [26-40; 24-54] и 32 [27-40; 22-62] года), анамнестическим данным, в том числе по частоте рецидивов пиодермии в течение предыдущего года, числу пустул/фурункулов до лечения (соответственно 8 [3-12; 1-25] и 16,5 [3-20; 1-30]) и другим исходным клиническим и лабораторным параметрам [4].

Все включенные в исследование пациенты завершили его в соответствии с протоколом. Не зарегистрировано ни одного случая непереносимости Полимурамила и нежелательных явлений, связанных с проводимым лечением.

При добавлении Полимурамила к стандартному лечению обострения хронической пиодермии обнаружен явный тренд к увеличению доли больных со значительным улучшением или улучшением на 14-й день исследования. В основной группе суммарная доля больных с любым клиническим улучшением была на 24% выше, чем в группе сравнения. Полимурамил в пять раз снижал относительное число больных с отсутствием эффекта от проведенного комплексного лечения. Однако значимость вышеуказанных различий соответствовала лишь уровню статистической тенденции (рис. 1).

Указанные тренды сохранялись в течение всего периода наблюдения (через 1 и 6 месяцев исследования). Так, через 1 месяц в основной группе доля больных со значительным улучшением более чем в два раза превышала таковую в группе сравнения, что математически было очень близко к уровню, когда можно констатировать статистическую тенденцию к отличию (p=0,102). И через 1, и через 6 месяцев наблюдения доля больных с отсутствием эффекта от проведенного лечения снижалась под влиянием иммуномодулятора более чем в два с половиной раза; однако степень различий между группами не достигала порога математически подтверждённой значимости, что можно по крайней мере отчасти объяснить небольшим количеством пациентов в группах (рис. 1).

Данные о более стремительном и стойком снижении числа пустул/фурункулов у больных, получавших Полимурамил в дополнение к стандартному лечению, были уже опубликованы [4]. Однако ранее при оценке способности иммуномодулятора увеличивать долю пациентов, у которых отсутствуют элементы пиодермии через 6 месяцев от начала исследования, использован двухсторонний точный критерий Фишера, что позволило зафиксировать положительный эффект Полимурамила по указанному параметру лишь на уровне статистической тенденции. В результате критического пересмотра варианта математической обработки этого фрагмента исследования, в настоящей работе применен более уместный односторонний точный критерий Фишера. В итоге выявлено статистически значимое межгрупповое различие по доле пациентов без пустул/фурункулов через полгода: 9 из 18 и 3 из 17 соответственно в основной группе и группе сравнения (p=0,047).

Индукцию длительной ремиссии заболевания под влиянием короткого курса применения Полимурамила можно рассматривать как проявление NOD-опосредованного репрограммирования клеток врожденного иммунитета и формирования стойкого состояния повышенной сопротивляемости инфекциям, т.е. феномена «тренированного иммунитета» [2].

Показатели спонтанной активности нейтрофилов по восстановлению НСТ исходно и в течение всего исследования были в рамках референсных значений у подавляющего большинства включённых в исследование больных. До начала лечения и на 14-й день наблюдения медиана индекса спонтанного восстановления НСТ немного выходила за нижнюю границу условной нормы в обеих группах. Через полгода в группе сравнения этот индекс входил в диапазон референсных значений, тогда как у больных, получавших Полимурамил, даже несколько снижался. При этом не выявлено математически подтверждённых изменений внутри групп и различий между группами по активности и индексу спонтанного восстановления НСТ нейтрофилами (табл. 1).

Не установлено значимых исходных сдвигов, существенной динамики и межгрупповых различий и при оценке индуцированного восстановления НСТ нейтрофилами (табл. 1).

Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число нейтрофилов также были в пределах референсных значений и не отличились между группами (табл. 1).

То, что клиническая действенность Полимурамила не сопровождалась вполне ожидаемыми значительными изменениями функциональной активности циркулирующих нейтрофильных гранулоцитов, можно объяснить особенностями дизайна исследования: отбор образцов крови для повторных иммунологических тестов выполняли через 9 дней (14-й день исследования) и полгода после окончания курса внутримышечных инъекций Полимурамила, когда прямые и опосредованные иммунокорригирующие эффекты иммуномодулятора в отношении функции короткоживущей популяции циркулирующих нейтрофилов и их предшественников могли нивелироваться другими эндогенными и экзогенными факторами.

Тенденцию к падению активности и индекса спонтанного НСТ-теста в основной группе через полгода наблюдения можно связать с клинической ремиссией заболевания и снижением выраженности стимулов для нейтрофилов со стороны патогенных микробов.

Абсолютное и относительное число клеток разных субпопуляций циркулирующих лимфоцитов (табл. 2) и показатели гуморального звена иммунитета (табл. 3) у подавляющего большинства больных обеих групп не выходили за рамки условной нормы в течение всего исследования. Исключение составляли только СD3‒CD16+CD56+-клетки, медиана абсолютного количества которых исходно несколько превышала верхнюю границу референсного диапазона и в дальнейшем колебалась около этого же уровня вне существенной зависимости от варианта проведенного лечения (табл. 2).

Не выявлено статистически значимых межгрупповых отличий субпопуляционного состава лимфоцитов и концентраций основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови на фоне высокой индивидуальной вариативности этих показателей. Вместе с тем у больных основной группы, в отличие от таковых группы сравнения, через 6 месяцев исследования отмечали тренд к повышению абсолютного числа Т-лимфоцитов (СD3+CD19‒-клеток) в крови за счет СD3+CD4+-субпопуляции (табл. 2), а также концентрации IgA в сыворотке крови (табл. 3).

Не вызывает сомнений актуальность дальнейшего поиска высокоинформативных иммунологических критериев диагностики, прогноза и оценки эффективности лечения хронической пиодермии. Вместе с тем результаты работы в целом говорят о клиническом приоритете при назначении и мониторинге действенности иммунотропных препаратов при заболеваниях, связанных с вторичной недостаточностью противоинфекционной защиты. Во-первых, сдвиги системных показателей клеточного и гуморального иммунитета, за редкими исключениями, не могут быть самостоятельными критериями назначения иммунокорригирующих средств. Во-вторых, изменения (в том числе нормализация) иммунологических параметров в большинстве клинических ситуаций едва ли могут отражать эффективность лечения хронических рецидивирующих инфекций. Первому и второму препятствуют: 1) широкий диапазон условно нормальных значений, а также высокая индивидуальная вариативность иммунологических показателей; 2) недостаточная ясность того, какое (флогогенное или защитное?) значение имеют исходные и/или вызванные иммунокорригирующей терапией иммунологические сдвиги у пациентов; 3) сложный многогранный характер взаимодействий между меняющимися на фоне проводимого лечения саногенетическими/патогенетическими процессами и биологическими эффектами самих иммуномодуляторов.

Таким образом, подтверждена клиническая эффективность Полимурамила в лечении обострений и индукции ремиссии хронической рецидивирующей пиодермии. При этом в рамках дизайна настоящего исследования и выбранных сроков взятия биологических образцов для лабораторных исследований иммуномодулятор существенно не изменял большинство изученных системных иммунологических показателей, за исключением ранее описанной модуляции уровня про- и противовоспалительных цитокинов [4].