

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Кузнецова Юлия Константиновна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ЗООНОЗНОГО КОЖНОГО ЛЕЙШМАНИОЗА НА
ЛАБОРАТОРНОЙ МОДЕЛИ**

03.02.11 – паразитология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор

Коваленко Феликс Павлович

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Эпидемиология кожного лейшманиоза (заболеваемость, группы риска, пути заражения)	14
1.2. Способы лечения кожного лейшманиоза.....	20
1.2.1. Способы лечения кожного лейшманиоза сквозь века.....	20
1.2.2. Современное состояние терапии кожного лейшманиоза.....	29
1.3. Новые аспекты этиопатогенеза кожного лейшманиоза (о вирусе, состоянии иммунитета, экспериментальных исследования в данном направлении)	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Выбор лабораторной модели животного.....	36
2.2. Отбор биологического материала для заражения лабораторных животных.....	37
2.3. Изучение специфической активности препаратов для лечения кожного лейшманиоза <i>in vitro</i>	38
2.4. Изучение токсичности противолейшманиальных препаратов	38
2.5. Изучение эффективности препаратов <i>in vivo</i> на лабораторной модели ЗКЛ.....	39
2.5.1. Подготовка инфекционного материала для заражения.....	39

2.5.2. Выбор адекватной модели животного.....	40
2.5.3. Методика введения инфекционного агента.....	40
2.5.4. Критерии отбора хомяков для эксперимента <i>in vivo</i>	41
2.5.5. Визуальная оценка эффективности препаратов по динамике кожного процесса.....	41
2.5.6. Микроскопическая оценка эффективности лечения по элиминации возбудителя из очагов поражения на коже.....	41
2.5.7. Фоторегистрация динамики клинических проявлений на коже животных.....	42
2.6. Статистическая обработка материала.....	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	43
3.1. Исследование эффективности препаратов для терапии зоонозного кожного лейшманиоза <i>in vitro</i>	43
3.1.1. Результаты исследования эффективности доксциклина <i>in vitro</i>	45
3.1.2. Результаты исследования эффективности цефотаксима (клафорана) <i>in vitro</i>	47
3.1.3. Результаты исследования эффективности цефтриаксона <i>in vitro</i>	49
3.1.4. Сравнительный анализ эффективности препаратов для лечения зоонозного кожного лейшманиоза <i>in vitro</i>	51

3.2. Проверка на лабораторной модели токсичности препаратов	
с противолейшманиальным эффектом, доказанным <i>in vitro</i>	54
3.3. Исследование эффективности препаратов для терапии зоонозного	
кожного лейшманиоза <i>in vivo</i>	59
3.3.1. Клиническая характеристика особенностей течения	
ЗКЛ при использовании золотистых хомяков в качестве	
лабораторной модели в эксперименте <i>in vivo</i>	61
3.3.2. Результаты оценки эффективности лечения меглумина	
антимонатом (глюкантимом) (контрольная группа)	
экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.....	65
3.3.3. Результаты оценки эффективности лечения	
доксидиклином экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.....	67
3.3.4. Результаты оценки эффективности лечения	
цефтриаксоном экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.....	69
3.3.5. Результаты оценки эффективности лечения цефотаксимом	
(клафораном) экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.....	70
3.3.6. Результаты оценки эффективности лечения интерфероном	
альфа-2b человеческим рекомбинантным (реаферон)	
экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.....	72
3.3.7. Результаты оценки эффективности комбинированного	
лечения меглумина антимонатом (глюкантимом) + интерферон	
альфа-2b человеческий рекомбинантный (реаферон)	

экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.....74

3.3.8. Результаты эффективности комбинированного лечения

доксациклином + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный

(реаферон) экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.....76

3.4. Сравнительный анализ эффективности препаратов для лечения

зоонозного кожного лейшманиоза у золотистых хомяков.....79

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....82

ВЫВОДЫ.....86

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....94

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Проблема кожного лейшманиоза (КЛ) в настоящее время актуальна для практикующих врачей. Это обусловлено активной миграцией населения в эндемичные по лейшманиозу регионы (туристические поездки, служебные командировки, работа по контракту и др.), а также приездом в РФ людей из стран, где данное заболевание регистрируется достаточно часто. КЛ является эндемичным заболеванием в 98 странах. Более 350 млн. человек, составляющих около 10% населения земного шара, находятся в зоне риска, более 12 млн. человек уже инфицированы, а ежегодное количество новых случаев оценивается в 1,5-2 млн. [83].

Данные официальной статистики о заболеваемости КЛ в РФ отсутствуют, т.к. заболевание не входит в перечень обязательных нозологических форм, подлежащих регистрации. Однако многочисленные публикации свидетельствуют о регистрации, как КЛ [70; 67; 65; 66; 72; 69; 71; 68; 64], так и висцерального лейшманиоза [62; 82; 79; 63; 80]. Имеются сведения, указывающие, что РФ с 1991 по 2014 год было зарегистрировано 89 случаев лейшманиоза (83 – завозных, 6 – при заражении на территории РФ) [29]. Это свидетельствует об актуальности КЛ для населения неэндемичных стран, каковой является Россия. У врачей практического здравоохранения возникают серьезные проблемы как в плане диагностики [65; 66; 64], так и выбора метода лечения [67; 68]. Анализ литературы свидетельствует, что КЛ sporadически завозится в Россию из стран Африки (Египет, Тунис), Ближнего Востока (Турция, Израиль, Кипр, Иордания, Азербайджан, Армения, Грузия) и СНГ (Узбекистан, Таджикистан). Основным возбудителем КЛ в этих регионах

является *Leishmania major* (*L. major*), вызывающим у человека зоонозный кожный лейшманиоз (ЗКЛ) [33]. Это определило выбор инфекционного агента для доклинического исследования.

В то же время стандарты по лечению данного заболевания в нашей стране отсутствуют. В национальном руководстве по дерматовенерологии (2013) для лечения КЛ предлагается использовать 12 препаратов, зарегистрированных в ГРЛС. Однако в инструкциях фирм производителей показания для лечения данного дерматоза имеются только у кетоконазола [17]. Хорошо зарекомендовавший себя для лечения ЗКЛ антибиотик из группы аминогликозидов (мономицин) в настоящее время в России не производится. Препарат 5-валентной сурьмы (солюсурьмин), поступавший в РФ из Туркмении, в ГЛРС РФ не зарегистрирован. В рекомендациях ВОЗ (2010), в Европейских рекомендациях по лечению лейшманиоза и в методических рекомендациях «LeishMan» для лечения КЛ предлагают меглумина антимоноат (глюкантим), пентастам (стибоглюконат натрия), милтефозин (импавидо), липосомальный амфотерицин В (амбисом), паромомицин, аминохинол, пентамидин [31]. Из перечисленных препаратов в ГРЛС имеется только амфотерицин В без указания, что он липосомальный, а в инструкции фирмы производителя нет показаний для лечения КЛ.

В связи с этим ценными являются публикации авторов, эмпирически лечивших больных ЗКЛ антибиотиками различных фармакологических групп. Это доксициклин [31; 68] и цефотаксим (клафоран – цефалоспорины 3 поколения) [37]. В тоже время данные о доклинических исследованиях данных препаратов в литературе отсутствуют. Учитывая, что цефотаксим (клафоран) – импортный препарат (Франция), то для исследования с целью импортозамещения актуальным является изучение *in vitro* и *in vivo* отечественного антибиотика из той же группы – цефтриаксона. Универсальным препаратом для лечения лейшманиозов являются препараты 5-валентной сурьмы. Поэтому меглумина антимоноат (глюкантим) может быть использован в качестве контроля при оценке эффективности других препаратов.

Исследования зарубежных специалистов, свидетельствуют, что этиологическим фактором заболевания могут быть не сами лейшмании, а вирус, находящийся в них (LRV – лейшманиальный РНК-вирус), обнаруженный в 1988 г. у больного, инфицированного *L. guyanensis* [75]. Позднее его обнаружили в *L. braziliensis* и указали на связь с более тяжелым течением КЛ вплоть до развития кожно-слизистого лейшманиоза [76]. Установлена корреляция между наличием вируса и иммунным ответом хозяина. Геномные нуклеиновые кислоты LRV экстрагировали из 50 культивируемых изолятов, принадлежащих к видам *L. major*, *L. tropica* и *L. infantum*. Определена частичная последовательность генов их вирусной РНК-полимеразы. Эти гены обнаружены в двух изолятах базы данных GenBank [77]. Доказано различие геномных последовательностей вирусов в лейшманиях Нового и Старого Света. Назначение препаратов сурьмы, разрушающих паразитов, приводит к распространению инфекции [78]. По сути, мы имеем дело с эндоцитобиозом вируса внутри лейшманий. При заражении хомяков лейшманиями, содержащими LRV, отмечен сильный воспалительный ответ за счет повышения уровня IFN- β , а также продление выживаемости паразитов с вирусом [78]. Это послужило основанием для изучения в доклиническом исследовании эффективности комбинированной терапии с включением противовирусного препарата – интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона).

Цель исследования: изучить *in vitro* и *vivo* на лабораторной модели эффективность препаратов для лечения зоонозного кожного лейшманиоза и дать им сравнительную оценку.

Задачи исследования

1. Изучить *in vitro* специфическую активность доксициклина (Россия), цефотаксима (клафорана) (Франция) и цефтриаксона (Россия), используемых

- по данным литературы для лечения кожного лейшманиоза, сравнив их эффективность с меглума антимонатом (глюкантимом) и между собой.
2. В эксперименте на лабораторной модели изучить токсичность препаратов – доксициклина, цефотаксима (клафорана), цефтриаксона, меглума антимоната (глюкантима) и интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона).
 3. В эксперименте *in vivo* дать клиническую характеристику особенностей течения ЗКЛ у золотистых хомяков, использованных в качестве лабораторной модели.
 4. Провести сравнительный анализ эффективности монотерапии антибактериальными препаратами (доксициклином, цефотаксимом, цефтриаксоном), препаратом 5-валентной сурьмы (меглума антимонатом / глюкантимом) и интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (реафероном) при лечении экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.
 5. Обосновать целесообразность использования интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона) в комплексной антилейшманиальной терапии.

Научная новизна работы

Впервые *in vitro* проведена сравнительная оценка трех антибиотиков (доксициклина, цефотаксима, цефтриаксона) на промастиготы лейшманий с учетом их *min* доз, количества протистов в поле зрения и показателя инактивации их подвижности. Установлено лидирование доксициклина и цефтриаксона. *Min* дозы обоих препаратов приводят к абсолютному подавлению подвижности возбудителя. Повышение терапевтической дозы препаратов не обосновано. Сравнение этих препаратов с меглума антимонатом (глюкантимом) показало их превосходство по всем показателям.

Впервые в эксперименте *in vivo* на золотистых хомяках доказано отсутствие токсического действия антибиотика доксициклина и иммуномодулятора интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного

(реаферона) и установлен выраженный токсический эффект препаратов из группы цефалоспоринов III поколения – цефотаксима (клафорана) и цефтриаксона.

Впервые *in vivo* доказана высокая противолейшманиальная активность антибиотика тетрациклинового ряда (доксциклина) при экспериментальном ЗКЛ у золотистых хомяков. На примере цефтриаксона показано несоответствие результатов *in vitro* и *in vivo*. В первом случае его эффективность была высокой, во втором – животные погибали.

Впервые *in vivo* установлен факт повышения эффективности доксициклина и меглумина антимоноата при комплексной терапии с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным. Использование интерферона в комплексной терапии свидетельствуют о синергизме данных препаратов. Это патогенетически проявляется в более раннем заживлении язвенного дефекта и элиминации лейшманий из очага поражения при значительном увеличении массы тела животных.

Теоретическая и практическая значимость работы

Преобладание специфической активности цефтриаксона над доксициклином в 2,6 раза (2,250 и 5,083) при количественном измерении числа промастигот установлено при min терапевтической дозе первого препарата, которая в 15 раз больше, чем у второго (0,009 г и 0,0006 г, соответственно). Только исследование *in vivo* может дать полную картину их эффективности

Золотистые хомяки, являющиеся «золотым стандартом» для воспроизведения экспериментальной модели ВЛ, с успехом могут быть использованы для воспроизведения экспериментальной модели ЗКЛ.

Несовпадение результатов эффективности цефтриаксона в эксперименте *in vitro* с доказанной токсичностью препарата и гибелью животных при использовании терапевтической дозы в эксперименте *in vivo* исключает его возможность использования в клинической практике.

Доказанный *in vivo* факт высокой противолейшманиальной эффективности антибиотика тетрациклинового ряда (доксциклина) при экспериментальном зоонозном кожном лейшманиозе у золотистых хомяков, повышение его эффективности в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным, разрешенных для применения в клинической практике у человека, расширяет показания для их использования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Доксциклин и цефтриаксон *in vitro* обладают высокой специфической активностью в отношении возбудителя ЗКЛ, значительно большей, чем меглумина антимоноата. Однако мин доза первого препарата в 15 раз больше, чем второго.
2. Доксциклин, меглумина антимоноата (глюкантима) и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (реаферон) при изучении их токсичности *in vivo* на золотистых хомяках не обладают таковой при увеличении терапевтической дозы препарата в несколько раз. Выраженной токсичностью обладают цефотаксим (клафоран) и цефтриаксон.
3. Меглумин антимоноата, доксциклин и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный эффективны при лечении ЗКЛ у золотистых хомяков. Цефтриаксон и цефотаксим (клафоран) в терапевтической дозе вызывают гибель лабораторных животных. Включение в комплексную терапию интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного повышает эффективность по всем показателям в сравнении с монотерапией.

Личный вклад автора

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, сформулированы цели и задачи, научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту. Разработан дизайн исследования. Вся экспериментальная работа *in vivo* и *in vitro* с регистрацией полученных результатов в специальные журналы и

статистическая обработка полученных данных выполнены самостоятельно. Лично написаны статьи, настоящая диссертация, подготовлены доклады и презентации для выступлений на научных конференциях.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; кафедры кожных и венерических болезней с курсом медицинской косметологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ; кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная Государственная Медицинская Академия» Управления делами Президента РФ; кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО «Оренбургский Государственный медицинский университет» МЗ РФ; кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» МЗ РФ.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы исследования доложены и обсуждены на Всероссийском Ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (С-Пб, 2014); на научно-практических конференциях с международным участием «Инфекции и противоинфекционный контроль в дерматологии» (Москва, 2017); на научно-практических конференциях с международным участием «Инфекции и противоинфекционный контроль в дерматологии» (Москва, 2018).

Апробация диссертации состоялась в Москве 27.08.2018 в Институте медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует шифру научной специальности: 03.02.11 «Паразитология» и формуле специальности. Область исследований при ЗКЛ соответствует пункт 6 (изучение клиники болезни у животных), 7 (разработка новых методов лечения паразитарных болезней).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них: 2 статьи с материалами собственных исследований в журналах, рекомендованных ВАК РФ; 3 статьи в рецензируемых журналах ВАК РФ; 1 руководство; 4 тезиса конференций; 2 статьи в журналах, не рецензируемых ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 118 источников, в том числе 44 отечественных и 74 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 19 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология кожного лейшманиоза (заболеваемость, группы риска, пути заражения)

Простейшие рода *Leishmania* представляют собой обширную группу паразитов, которые передаются от млекопитающего к млекопитающему посредством кровососущих moskitov, 500 видов которых идентифицировано на сегодняшний день [84]. Мосkitы питаются кровью определенных млекопитающих для откладки яиц. При включении в пищевую цепочку человека происходит его заражение [41; 48; 43]. Природным резервуаром паразитов являются животные – домашние и дикие собаки, грызуны, лисицы, шакалы, волки, еноты, даманы, ленивцы, трубкозубы, опоссумы, а также крысы и мыши. Считается, что в Индии люди являются основным резервуаром возбудителя висцерального лейшманиоза (ВЛ).

Инфекция человека, вызванная патогенными видами *Leishmania* и приводящая к хроническим заболеваниям кожи и внутренних органов, имеется как в Старом, так и в Новом Свете. Лейшманиозы являются паразитарными эндемичными заболеваниями, которые широко распространены в мире и затрагивают преимущественно экономически неблагополучные слои населения в сельских районах тропических и субтропических стран [28]. Число стран, являющихся эндемичными по лейшманиозу, постоянно увеличивается. По данным 2004 года таких стран было 88, из них 67 – в Старом Свете и 21 – в Новом Свете [94]. Спустя 9 лет их уже стало 98 [83]. Более 350 млн. человек, составляющих около 10% населения земного шара, находятся в зоне риска [83]. Важно отметить, что по данным ВОЗ, в настоящее время в мире насчитывается около 12 млн. больных лейшманиозом [52]. Ежегодное число впервые зарегистрированных случаев лейшманиоза в 2008 году составляло около 400

тыс. [95], а к 2013 году достигло 1,5-2 млн. [83]. В мире эндемичными регионами по лейшманиозу являются Средний Восток (Афганистан, Кипр, Иран, Ирак, Иордания, Израиль, Кувейт, Ливан, Македония, Черногория, Палестина, Саудовская Аравия, Сирия и Йемен); Африка (Камерун, Центральноафриканская Республика, Египет, Гамбия, Ганы, Гвинея, Гвинея-Бисау, Кения, Ливийская Арабская Республика, Мали, Мавритания, Марокко, Намибия, Нигер, Нигерия, Оман, Сенегал, Сомали, Судан, Тунис и Уганда); Дальний Восток (Бангладеш, Китай, Индия, Пакистан, Непал и Шри-Ланка); Восточная Европа (Албания, Алжир, Армения, Азербайджан, Болгария, Босния и Герцеговина, Хорватия, Грузия, Казахстан, Киргизия, Румыния, Словения, Украина, Узбекистан и Туркменистан); Западная Европа (Греция, Франция, Италия, Мальта, Монако, Португалия, Испания и Турция); Центральная Америка (Коста-Рика, Доминиканская Республика, Гватемала, Гондурас, Мексика, Никарагуа и Панама); Северная Америка (Соединенные Штаты); Латинская Америка (Аргентина, Белиз, Боливия, Бразилия, Колумбия, Эквадор, Французская Гвиана, Гайана, Парагвай, Перу, Суринам и Венесуэла). В список не включены страны, в которых вид лейшманиоза не определен [33]. Существенно, что около 95% случаев заболевания отмечается в Америке, в Средиземноморском бассейне, на Ближнем Востоке и в Средней Азии. Более 2/3 случаев приходится на 6 стран: Алжир, Афганистан, Бразилию, Колумбию, Иран, Сирию [21]. Ежегодная смертность от лейшманиоза составляет от 20 тыс. до 30 тыс. случаев [93].

В РФ за 24 года (1991-2014) было зарегистрировано 89 случаев лейшманиоза: 83 – завозных из 24 стран мира (93,3%), 6 – местных (6,7%) при заражении на территории РФ. ЗКЛ выявлен у 20 (22,5%) человек [29]. По данным автора завозной антропонозный кожный лейшманиоз прибыл в Россию из Азербайджана, Афганистана, Грузии, Кипра, Сирии, Таджикистана, Туркменистана, Турции, а зоонозный кожный лейшманиоз – из Израиля, Индии, Ирака, Ирана, Иордании, Коста-Рика, Судана, Туниса, Туркменистана, Узбекистана. Интересно отметить, что на последние 4 года (2011-2014)

приходится четверть (23 больных или 25,8%) случаев, что свидетельствует о росте числа завозного лейшманиоза в РФ. Эти больные прибыли в Россию из стран СНГ – Азербайджана, Армении, Грузии, Кыргызстана, Таджикистана, Узбекистана [20].

После распада СССР за пределами границ РФ остались эндемичные по лейшманиозу территории Закавказья и Средней Азии. Единичные местные случаи висцерального лейшманиоза регистрируют на территориях Дагестана и Крыма. Однако проблема ЗКЛ в настоящее время актуальна для практикующих врачей. Это обусловлено миграцией населения РФ в эндемичные по лейшманиозу регионы (туристические поездки, служебные командировки, работа по контракту и др.). В Россию также нередко приезжают люди из стран СНГ, Ближнего Востока, Азии, Африки и Латинской Америки, где ЗКЛ регистрируют достаточно часто. По данным ФМС России в 2008 г. на миграционный учет было поставлено около 9 млн. иностранных граждан, в основном из стран СНГ. По некоторым оценкам, общая численность работающих в России иностранцев достигает 10-12 млн. человек, включая нелегальную составляющую [24].

В настоящее время ЗКЛ sporadически завозят в Россию из стран Северной Африки (Египет, Тунис), Ближнего Востока (Турция, Израиль, Иордания), СНГ (Азербайджан, Армения, Узбекистан, Таджикистан), Грузии, где основным возбудителем является *Leishmania major* (*L. major*), вызывающим у человек ЗКЛ [33]. Многочисленные публикации специалистов свидетельствуют о выявлении завозных случаев как кожного [70; 67; 65; 66; 72; 69; 71; 68; 64], так и висцерального лейшманиоза [62; 88; 79; 63; 80].

В резолюции ВОЗ по научным исследованиям в области тропических болезней Ассамблея здравоохранения признала, что лейшманиоз продолжает оставаться актуальной проблемой общественного здравоохранения, особенно в случаях с ко-инфекцией ВИЧ. Сочетание этих двух инфекций зарегистрировано в 34 странах мира [50; 51].

Большое значение в эпидемиологии лейшманиоза играют политические и военные события в ряде стран [46; 45]. Примером может служить республика Таджикистан. Гражданская война, начавшаяся в 1992 году, оказала весьма негативное влияние на состояние заболеваемости лейшманиозом. Неконтролируемая массовая миграция населения, отсутствие мероприятий по борьбе с переносчиками, прекращение работы общих и специальных служб здравоохранения, рост численности переносчиков, резервуаров болезни – грызунов, отсутствие противомоскитных дезинсекционных обработок, недостаточное санитарно-гигиеническое воспитание населения – все эти факторы привели к ухудшению эпидемиологической ситуации по лейшманиозу в республике [96].

В таблице 1 приведены обобщенные сведения о видах паразита, клинических формах лейшманиоза, странах, где они регистрируются и схемах терапии [33].

Таблица 1 – Географические регионы, клинические формы лейшманиоза, виды возбудителей и схемы лечения.

Виды	Заболевания	Географическое местонахождение	Лечение
Старый Свет			
<i>L. major</i>	КЛ	Ближний Восток, Африка	Местно: t-paro, il-Sb, il-Sb + CT, HT, CT Системно: Flu, s-Sb, s-Sb + ptxf
<i>L. tropica</i> <i>L. infantum</i>	КЛ	Ближний Восток, Средиземноморье, Африка	Местно: t-paro, il-Sb, il-Sb + CT, HT, CT Системно: s-Sb, s-Sb + Allo
<i>L. aethiopica</i> <i>L. donovani</i>	РЛ, КЛ, ВЛ	Африка; Дальний Восток	s-SB + im-paro L-AmB, L-AmB + Mil, L-AmB + im-paro, Mil + im-paro AmB, Mil, im-paro, s-Sb
<i>L. infantum</i>	ПККЛ, ПККЛ, ВЛ	Африка Дальний Восток Африка Средиземноморье, Восточная Европа, Дальний Восток	s-Sb + im-paro, s-Sb, L-AmB, AmB, Mil AmB, Mil L-AmB, s-Sb L-AmB, AmB, s-Sb
Новый Свет			
<i>L. infantum/chagasi</i>	ВЛ	Центральная и Южная Америка	L-AmB, AmB, s-Sb
<i>L. mexicana</i>	КЛ	Северная, Центральная и Южная Америка	Местно: t-paro, HT, il-Sb Системно: Ket, Mil
<i>L. amazonensis</i>	КЛ, ДКЛ	Южная Америка	Местно: t-paro, HT, il-Sb Системно: s-Sb
<i>L. panamensis</i>	КЛ	Центральная и Южная Америка	Местно: t-paro, HT, il-Sb Системно: Pent, s-Sb, Mil
<i>L. braziliensis</i>	КЛ, КСЛ	Центральная и Южная Америка	Местно: t-paro, HT, il-Sb Системно: AmB, L-AmB, s-Sb
<i>L. guyanensis</i>	КЛ	Южная Америка	Местно: t-paro, HT, il-Sb Системно: Pent, s-Sb, Mil
<i>L. peruviana</i> <i>L. venezuelensis</i>	КЛ	Южная Америка	Местно: t-paro, HT, il-Sb Системно: s-Sb
Все виды	РКЛ, ДКЛ или КСЛ		AmB, L-AmB, s-Sb + t-imi или immunotherapy

Сокращения, использованные в таблице 1:

КЛ – кожный лейшманиоз	Flu – флуконазол
ВЛ – висцеральный лейшманиоз	Mil- Милтефозин
ВЛ – висцеральный лейшманиоз	t-paro – местный паромомици
КСЛ – кожно-слизистый лейшманиоз	AmB – амфотерицин дезоксихолат
ПККЛ – пост-кала-азар кожный лейшманиоз	im-paro – внутримышечный паромомицин
ДКЛ – диффузный кожный лейшманиоз	L-AmB – липосомальный амфотерицин В
РЛ – рецидивирующий лейшманиоз	СТ – криотерапия
РКЛ – рецидивирующий кожный лейшманиоз	НТ – термотерапия
Sb – стибоглюконат	Pent – пентамидин
il-Sb – внутриочаговый стибоглюконат	Ptxf – пентоксифиллин
s-Sb – системный стибоглюконат	Allo – аллопуринол
Ket – кетоконазол	t-imi – местный Имиквимод

1.2. Способы лечения кожного лейшманиоза

1.2.1. Способы лечения кожного лейшманиоза сквозь века

Кожный лейшманиоз был известен уже в глубокой древности. Описание безболезненных язв, появляющихся после купания или укуса мухи, имеются в книге Яджур-Вег (IV век до нашей эры) [1]. Кожный лейшманиоз был распространен в войсках персов, ассирийцев и греков [2]. Первые достоверные литературные данные о кожном лейшманиозе относятся к 1745 г., когда, после своего путешествия по Сирии, англичанин Richard Pococke в «A Description of the East and Some other Countries» познакомил Европу с этим доселе невиданным «прыщом». В России первая работа о кожном лейшманиозе была представлена Н. А. Арендтом – врачом русского посольства в Тегеране, в 1861 г. в диссертации «О солке или алеппском прыще». Исследования проводились в Персии.

Позднее в газете «Кавказ» появились статьи М. В. Скорова о «Елисаветпольском годовике» (1864) и «Годовик или персидская болезнь в городе Елизаветполе» (1868) [11]. В том же году опубликовал свою работу по этому вопросу Я. Талько. В 1878 г. вышла в свет работа Л. Л. Гейденрейха «Пендинская язва», оснащенная атласом, что на 12 лет раньше публикаций Leloir и Vidal. Последующие работы связаны с военными операциями в бывшей Закаспийской области (1879—1881). При этом сам возбудитель болезни, получивший в дальнейшем название *Leishmania*, был открыт только лишь в 1898 г. П. Ф. Боровским [4].

В 1904 г. появилась статья Е.И. Марциновского и С. Л. Богрова «К вопросу об этиологии восточной язвы». В данной работе тщательно описан возбудитель, которого авторы относят к простейшим, близким к трипаносомам. К статье приложена хорошая микрофотография, отчетливо изображающая виденных авторами паразитов. Это первая работа на русском языке и одна из первых в мире, где сделано строго научное, точное описание строения

возбудителя болезни Боровского, описание ядра и кинетопласта, вакуоли, протоплазмы и указана внутриклеточная локализация паразита. В 1909г в свет появляется известная диссертация Е.И. Марциновского «Этиология «восточной язвы» (boutton d'Orient) и краткие сведения об этой болезни». С давних пор и до недавнего времени диагностика лейшманиоза основывалась на микроскопическом методе исследования, при котором врачи-лаборанты пользовались подробным описанием паразита, сделанным Е. И. Марциновским. Современные врачи оснащены более широким спектром методов диагностики лейшманиоза, в том числе и метод ПЦР диагностики [9].

Литературные источники о лечении кожного лейшманиоза до 30-х годов прошлого столетия свидетельствуют о попытках химиотерапии заболевания разнообразными средствами. Болезнь Боровского пытались лечить еще до возникновения официальной медицины. В арсенале народных знахарей существовали целые группы средств и различные схемы лечения. В настоящем обзоре максимально освещены средства терапии КЛ, существовавшие на территории Царской России и бывшего СССР с давних времен по настоящее время.

Во времена, когда медицина еще только зарождалась, использовали те средства, которые только через много лет получили научное обоснование и вошли в медицинский обиход. Некоторые из этих средств применяли в начале 1940 годов. В чистом виде использовали уксусную эссенцию, воск, канифоль, свиное сало и др. Практиковали своеобразную криотерапию инеем, ледяной сосулькой. Применяли каленое железо (в последствии аппарат Пакелена), химические чернила (современные анилиновые красители). Народные знахарские средства можно разделить на шесть групп: растения, разрушающие методы, химические средства, физические методы лечения, жиры и жироподобные вещества [3]. Из растений использовали сок маклюры, саккиз (сок дерева), семена клещевины, капустный лист, листья и сок айлантуса, а также продукты из растений (зола саксаула, зола ореховой скорлупы, зола бумаги, древесный порошкообразный уголь, деготь). Разрушающие методы

базировались на применении кислот (уксусная, соляная, азотная, соляная, насыщенная цинком, серная с древесным углем кислоты), так и не кислотные (каленное железо, медный купорос, паташ, квасцы, полутахлористое железо). Химические средства представлены различными веществами – киноварь с дегтем, автол, химический карандаш, керосин, колесная мазь. К физическим методам относятся использованием инея, снега, ледяной сосульки. Жироподобным веществам, обладающими якобы способностью исцеления от кожного лейшманиоза, считали: животные жиры (рыбий жир, свиное сало, воск, козье сало, сливочное масло, стеарин, бараний мозг) и растительные жиры (деревянное масло, камфорное масло, хлопковое масло, вазелиновое масло). Кроме того в некоторых случаях рекомендовали лечить пендинскую язву кислым молоком (сюзьма), соком верблюжьего клеща, пережженным навозом с кошмой, капустным листом, подорожником и др.

Профессор В. Л. Якимов в 1913 г. считал, что лечение кожного лейшманиоза индивидуально – каждый врач лечит его по-своему [5]. Начиная с 1909 г. наиболее распространенными методами лечения стали применение различных прижигающих и вяжущих средств: каленое железо, едкий калий (Гейденрейх), хром (Черепнин), ляпис и Liq. Bellosti (Рапчевский), молочная кислота (Маноцков, Шульгин), хлористый цинк (Мышкин, Сатинский) [4]. Е.И. Марциновский достигал положительного эффекта при смазывании самой язвы и введении в кожу вокруг нее 50% раствора *Chinini bimuriatici* (по 1.0 через день). Полное заживление язвы зарегистрировано после ее хирургического иссечения с использованием анестезии кокаином.

И, действительно, терапия КЛ к 30-40 гг. двадцатого столетия весьма разнообразна, было предложено достаточно много различных методов борьбы с тельцами Боровского, эффективность которых, зачастую, оставалась под вопросом. Авторов того времени можно разделить на два довольно резко разграниченных полюса. С одной стороны, имеется большое количество авторов-оптимистов, предлагающих тот или иной метод лечения, который, по их мнению, дает прекрасный результат. С другой стороны, имеется ряд других

авторов-пессимистов, опирающихся на большие личные наблюдения и считающих, что удовлетворительных методов до сих пор не существует и что лучше всего воздерживаться от лечения. К первой группе относятся в основном врачи, наблюдавшие кожный лейшманиоз вне его эндемических очагов. Иногда с недостаточно обоснованными выводами выступают также врачи, побывавшие непосредственно в очагах кожного лейшманиоза, но в течение короткого времени. Скептиками обычно являются специалисты, наблюдавшие большое количество больных непосредственно на месте заболевания (Л. Л. Гейденрейх, Шарль Луи Альфонс Лаверан, И. И. Гительзон и др.). Можно отметить две основные причины указанного расхождения. Первая заключается в том, что большинство авторов-оптимистов основывает свои выводы на малом количестве наблюдений, получая кажущийся хороший результат в единичных случаях, экстраполируют на массовый материал. При этом зачастую не учитывается естественный цикл заболевания, способность к саморазрешению. В ином положении находятся врачи, работающие непосредственно на месте массовых заболеваний кожным лейшманиозом и наблюдающие одного больного длительно [14]. Е. И. Марциновский писал, что «если приступить к лечению язвы любым препаратом в период, когда она переходит в последнюю фазу заживления, то эффект получается блестящий; наоборот, при лечении начальных форм заболевания обычно почти все средства оказываются несостоятельными» [4].

Имеющиеся тогда данные о результатах практического применения различных препаратов были недостаточны для окончательных выводов. Кожевников П. В. и соавторы считают, что «теоретическая разработка химиотерапии лейшманиоза находится в зачаточном состоянии; специальных работ, посвященных этой проблеме, почти нет, лейшманиологи в основном идут по следам смежных специальностей. Так как лейшмании относятся к типу *Protozoa*, то естественно было бы ожидать, что те или иные химиопрепараты, действующие на трипаносомы, плазмодий и других простейших, могут оказаться активными и в отношении лейшманий. Поэтому ряд

соответствующих препаратов испробован при кожном лейшманиозе». Так, например, «действие препаратов сурьмы при кожном лейшманиозе оказывается гораздо менее эффективным, чем при внутреннем» (висцеральном) лейшманиозе [13].

Остановлюсь на основных препаратах и способах лечения кожного лейшманиоза, применяемых в 1930-1940х годах, подробнее. Можно выделить несколько принципиальных методов лечения: физические методы, хирургическое лечение, местно применяемые медикаментозные средства, климато- и курортолечение, вакциноterapia, химиотерапевтические средства. Из возможных физических методов лечения кожного лейшманиоза использовали рентгенотерапию, радиотерапию, светолечение, электролечение (дигтермию), Д'Арсонваль, ионтофорез, криотерапия. Хирургический метод лечения КЛ известен давно. В 1915 г. доктор Abraham применял удаление пораженного фокуса острой ложечкой с последующим наложением йодоформной повязки, в 1914-1916 гг. Pulwermacher и ряд других авторов Walzberg, Ledermann, Hirschman, Hodara-Bey путем эксцизии удаляли пораженный фокус, захватив попутно и часть окружающей здоровой ткани (демаркационную зону) во избежание рецидивов. Метод несостоятелен в области лица. Местные медикаментозные средства нашли применения при кожном лейшманиозе в форме мазей, присыпок, пластырей, мушек, компрессов и т.д. Наиболее часто на тот момент среди всех наружных средств находили применение марганцовокислый калий, предложенный впервые Benoit. И. И. Рапчевский рекомендовал ежедневное смазывание эффоресценций (лат. Effloresco – расцветать) кожного лейшманиоза сулемовым коллодием (1:300). В. В. Войцеховский и Гизлер рекомендовали применение мушек. А.И. Пospelов получал хорошие результаты от 2% борной кислоты в форме примочки. В. Л. Якимов применял присыпание язв порошком метиленовой зелени. О. В. Петерсен применял с хорошим успехом йодную настойку с последующим долечиванием ксероформенной пастой 5-10%, при чем эффоресценции в первоначальном периоде автор «раскрывал» 2-5% раствором

салициловой кислоты в коллодиуме [19]. Б. Н. Деревщиков применял хинную мазь в восходящей концентрации от 10 до 50%. Любопытно, что эти же средства в руках других авторов оказывались совершенно недейственными. И поиски продолжались вновь. Доктор К. Я. Шульгин, а до него еще доктор Е. В. Корчиц во «Врачебная газета» №17, 1924г предлагали «специфическое средство» в виде 50% сурьмяной мази, между прочим, подобную терапию применяли уже очень давно в Греции (профессор Фотинос). Каждый последующий автор, отвергая предшествующие средства как мало действующие, не состоятельные, предлагает, как правило, взамен более действенное, специфическое. Вся эта частая смена средств «более специфическими» имеет уже свою историю, однако, они все до сих пор мало приносят пользы больным и удовлетворение врачу. Профессор В.Л. Якимов в 1913 г. заметил, что каждый врач эндемических мест, лечащий пендинку, имеет «свое средство», «свой метод». Как know-how терапии кожного лейшманиоза к 1930 гг. можно отметить появление двух средств, применяемых местно при кожном лейшманиозе. В Париже на заседании общества тропической патологии 14 ноября 1928 года профессор Е. Lerat сообщил о применении им в 62 случаях кожного лейшманиоза препарата «Synectol». Данный препарат состоит из экстрактов 5 растений: *Cupressus sempervirens*, *Plantago eropoea*, *Mesenbryanthemum*, *Teucrium shamoedrys*, *Plantago lauceolata*, соединенных между собой ланолином и маслом какао. Перед употреблением препарат расплавляется до 110-120°C, таким образом проводилось первые пять приложений, последующие приложения проводились при температуре 60-80°C. Из отечественных авторов, имевших возможность проверить препарат, были доктор А. В. Брайтцев и доктор И. Н. Пикуль. Данный метод имел неплохие результаты, однако требовал еще дальнейших наблюдений и исследований. Вторым новейшим препаратом того времени явился «Тропин-52». В 1929г профессор Е. И. Марциновский, работая в Мервском оазисе со своими сотрудниками, представил этот препарат, приготовленный в возглавляемом им Тропическом институте в Москве. Состав данного препарата не раскрывался,

методика применения была освещена. Перед употреблением ампулу не вскрывая погружают на 5 минут в воду, нагретую до 38-40⁰С, после чего средство в виде примочки или компресса накладывают один или два раза в день. Однако в последствие автором И. И. Гительзоном в ряде испытаний не были подтверждены терапевтические свойства «Тропин-52» в отношении кожного лейшманиоза [5].

Среди немногих врачей бытовало мнение, что климатотерапия эффективна при лечении кожного лейшманиоза. Профессор А. И. Поспелов в своем руководстве 1907 г. пишет: «болезнь исчезает, и сама собой с переменой более холодного климата». Однако и этот метод не увенчался успехом. А среди некоторой части населения, уже не врачей, было убеждение, что успешно курортолечение, сопровождавшееся бальнеотерапевтическими процедурами. На практике под наблюдением врача С. П. Катымова ни у одного из 40 пациентов с кожным лейшманиозом не отмечено никакого эффекта от лечения грязью в санаторно-курортных условиях.

К 1928 г. в СССР начали разрабатывать методы вакцинотерапии и вакцинопрофилактики кожного лейшманиоза: Е. И. Марциновский в Москве, А. Н. Ходукин, Н.И. Латышев в Ташкенте. Под руководством А. Н. Ходукина доктор Я. Блох на Мервской тропической станции занялся изготовлением вакцины. Она вводилась больному внутрикожно, начиная с 0,1 мл (250000000 лейшманийных тел), доходя до дозы 0,25-0,3 мл (620-750 млн. лейшманийных тел) с интервалами в 3-4 дня. Осмотры проводились через 3 и 6 недель после окончания терапии. Эта вакцинотерапия оказалась неэффективной. В 1928 г. кожный лейшманиоз пробовали лечить аутогемотерапией, опять без эффекта [5].

Химиотерапевтические средства для лечения кожного лейшманиоза были представлены сальварсаном и неосальварсаном. О. В. Петерсен и его последователи отмечали положительный эффект у больных с переменным успехом. После повторных инъекций (иногда до 10-12) в препаратах выявляли в большом количестве морфологически неизменные лейшмании [5]. Еще

одним средством, имевшемся в арсенале врачей начала XX века, был осарсол (мышьяковая кислота). Его применяли как *per os*, так и в форме присыпки. Авторы отметили, что использование осарсола приводит к разрешению сопутствующих кожному лейшманиозу проявлений сифилитической инфекции на коже. Но при лейшманиозе он оказался неэффективным [5].

Кожный лейшманиоз пытались лечить препаратами ртути, йодистым калием, ихтиолом, препаратами золота, хинином. Эффект отсутствовал, а при использовании препаратов золота отмечены резко выраженные побочные явления.

Несмотря на разноречивые результаты, полученные отдельными авторами, большинство исследователей и врачей считают препарат Рвотного Камня (препараты сурьмы) одним из наиболее эффективных препаратов лечения кожного лейшманиоза. Впервые сурьмяные препараты при кожном лейшманиозе были опробованы Vianna и Machado в 1913 г. при американском лейшманиозе с положительным результатом. Cristina и Coronia в 1915 г. применяли рвотный камень для лечения лейшманиоза у детей и указали на выраженный специфический эффект [5; 13]. Из отечественных авторов сурьму применяли при генерализованном и кожном лейшманиозе М. И. Слоним, А. Н. Ходукин, Р. С. Гершеневич, А. В. Артамонов, А. С. Прядко, М. Б. Султанов и Д. С. Худадов, Н. Уйманов, А. И. Блинников и другие. Профессор М. И. Слоним по поводу леченных им двух больных кожным лейшманиозом препаратом сурьмы пишет: «Терапия кожного лейшманиоза за последнее время вступила на многообещающий путь – химиотерапии» [7]. Результаты, полученные всеми авторами, довольно разноречивы. Одни авторы считали препараты сурьмы специфичными только при генерализованном лейшманиозе, другие – и при кожном лейшманиозе.

Объемную работу провела Н. В. Добротворская и соавт., изучая действие акрихина. Разрешение наступает через стадию некроза, даже если препарат вводили в недавно сформированную воспалительную папулу. Таким образом миновать рубца так и не удавалось [10].

По мнению доктора А. А. Макарына кожный лейшманиоз вообще не следует лечить. При абортивной или сухой формах кожного лейшманиоза автор считал применение какой-либо терапии противопоказанным. Его мнение базировалось на двух соображениях: а) оставленные без лечения эти формы лейшманиоза заканчиваются более нежным в косметическом отношении рубцом, чем получается после лечения; б) в процессе «самостоятельного исчезновения» кожного лейшманиоза успевает выработаться иммунитет, предохраняющий от повторной инфекции. Докторами Н. С. Тер-Маркарянцем и А. А. Макарыным были испытаны все известные в литературе к началу 1930-х годов методы лечения кожного лейшманиоза. Авторы пришли к заключению, что каждый отдельный случай заболевания требует индивидуального подхода[1].

К середине 1940 г. весомое значение приобретают систематические исследования на животных. Как известно, действие многих химиотерапевтических препаратов в макро-организме резко отличается от действия в пробирке. Сотрудники Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского под руководством О. И. Келлиной, а также коллектив ученых Туркменского НИИ кожно-венерологического института (П. В. Кожевников, Н. В. Добротворская, А. Н. Соколова, А. А. Шахова) создали модельные линии экспериментального кожного лейшманиоза на белых мышах. Было установлено, что заболевание у животных протекает аналогично таковому у человека, плохо поддается лечению различными методами, в очагах поражения легко обнаруживаются лейшмании, весь процесс продолжается 4-5-7 и более месяцев [12; 14]. Это позволило использовать разработанную модель в основу планомерного научного изучения действия различных химиопрепаратов на возбудителей кожного лейшманиоза [13].

Бесценен вклад советских ученых, в том числе О. И. Келлиной, разработавших и внедривших в широкую практику эффективные препараты: антибиотик мономицин и препарат пятиявалентной сурьмы солжусурмин. Было

доказано, что мономицин, при введении его под кожу, намного более эффективен, чем при введении его *per os* [12].

С распадом СССР производство этих антибиотиков на территории Российской Федерации прекращено. «Тот разнбой в лечении кожного лейшманиоза, о котором профессор Якимов писал еще в 1913 г., к сожалению, существует еще до сих пор. Пока еще нет специфического средства и нет единого мнения о принципах лечения», – так писала Н. В. Добротворская еще в далеком 1940 году [20]. Самое поразительное, что эту цитату можно и сейчас считать достаточно современной и актуальной.

1.2.2. Современное состояние терапии кожного лейшманиоза

Стандарты по лечению КЛ в нашей стране отсутствуют. В национальном руководстве по дерматовенерологии (2013) и в Федеральных клинических рекомендациях (2016) для лечения КЛ предлагается использовать 12 препаратов, из которых только 10 зарегистрированы в ГРЛС: меглумина натрия сукцинат, амфотерицин В, интерферон альфа, дапсон, рифампицин, левамизол, кетоконазол, хлорохин (делагил), фуразолидон, производные диамидина, соллюсурьмин, аминохинол [73; 74]. Однако в инструкциях фирм производителей, и то не всех, показания для лечения данного дерматоза имеются только у кетоконазола. В некоторых странах кетоконазол из-за побочных действий в медицине не применяется [68]. Производных диамидинов, соллюсурьмина, аминохинола нет в ГРЛС, то есть они не зарегистрированы в России. В то время как меглумина натрия сукцинат, амфотерицин В, интерферон альфа, дапсон, рифампицин, левамизол, хлорохин (делагил), фуразолидон имеются в ГРЛС, однако в показаниях инструкций фирм производителей нет указаний на применение при лейшманиозе. Хорошо зарекомендовавший себя для лечения ЗКЛ антибиотик из группы аминогликозидов (мономицин) в настоящее время в России не производится.

Препарат 5-валентной сурьмы (солюсурьмин), поступавший в РФ из Туркмении, в ГЛРС РФ не зарегистрирован. С распадом СССР более не поступает. В тоже время, в Туркмении этот препарат используется для лечения ЗКЛ. Он представляет собой натриевую соль комплексного соединения пентавалентной сурьмы и глюконовой кислоты. Препарат вводится из расчета 0,35 мл на кг массы взрослым (на курс 7-8 мл на кг); 0,5 мл на кг массы детям до 7 лет, (курсовая доза 7,5-9 мл кг). Препарат вводится 2 раза в день. Количество курсов 3-4. По данным литературы препарат обладает выраженной эффективностью [99; 98; 97].

Популярным и эффективным средством был также мономицин в виде мази или внутримышечного раствора. Однако с распадом СССР и этот препарат стал недоступен для лечения. Пациентов с кожным лейшманиозом лечили путем внутримышечного введения 250 000 единиц мономицина каждые 8 часов в течение 10 дней [101].

Производные диамидинов не самые популярные и эффективные препараты, которые применяли для лечения лейшманиозов [102]. При кожном лейшманиозе и диффузном кожном лейшманиозе доза составляет по 3-4 мг/кг 1-2 раза в неделю до отрицательного результата в мазке.

Небольшое число авторов лечили лейшманиоз аминохинолом [103]. Однако в настоящее время его нет в наличии в аптеках, а также имеются данные о его токсическом эффекте на почки и печень. Применяли данный препарат внутрь после еды: 100-150 мг 3 раза в день циклами по 10-15 дней с перерывом 5-7 дней между циклами. Число циклов определялось, ориентируясь на наличие или отсутствие паразита в мазках.

В случае лечения дапсоном побочное действие препарата превышает его эффективность и целесообразность применения. Опыт использования врачами Кувейта данного препарата в качестве монотерапии продемонстрировал 56,41% успеха [104].

Для лечения лейшманиоза назначают также рифампицин, левамизол, кетоконазол, хлорохин (делагил), фуразолидон с переменным успехом.

Очевидных данных в пользу однозначного успеха вышеперечисленных препаратов не имеются [107; 106; 105; 109; 110; 108].

В рекомендациях ВОЗ (2010), в Руководство по ведению случаев и эпиднадзору за лейшманиозами в Европейском регионе ВОЗ (2018) и в методических рекомендациях «LeishMan» [56] для лечения КЛ предлагают меглумина антимонат (глюкантим), пентастам (стибоглюконат натрия), милтефозин (импавидо), липосомальный амфотерицин В (амбисом), паромомицин, аминохинол, пентамидин. Из перечисленных препаратов в ГРЛС имеется только амфотерицин В без указания, что он липосомальный, а в инструкции фирмы производителя нет показаний для лечения КЛ.

Рекомендуют при КЛ различные пути введения лекарственного средства: местное или системное. Вышеперечисленные практические рекомендации предлагают использовать системную терапию в следующих случаях:

1. Локализация поражений имеет важное эстетическое или функциональное значение;
2. Поражения располагаются в участках, которые затруднительны для местного лечения, например, вокруг глаз;
3. Большое количество высыпаний;
4. Поражения кожи приводят к функциональным расстройствам;
5. Наружное лечение не было эффективным;
6. Пациент имеет иммуносупрессию.

При этом наружное лечение включает в себя:

- Физические методы: криодеструкция, электрохирургическое лечение, лазерная абляция и фотодинамическая терапия [113; 7; 114];
- Медикаментозная наружная терапия: мазь с паромомицином [22; 115] и внутриочаговые инъекции препаратом пентавалентной сурьмы (Пентостам)[116].

Всемирная организация здравоохранения в 2010 г. утвердила перечень препаратов, рекомендуемых для лечения КЛ:

1. Препараты пятиявалентной сурьмы: мнн — меглумина антимоноата (Глюкантим, Франция); мнн — стибоглюконат натрия (Пентамидин, Великобритания). Считается, что данные препараты специфического воздействия на лейшманий. Глюкантим вводится в/в (предпочтительнее) или в/м — 20 мг/кг/сут (не более 0,85 г/кг) в течение 20-28 дней [52; 112]. При кожной форме инфекции возможно местное применение путём обкалывания краев язвы [26; 8].

2. Противоопухолевое средство для местного применения: мнн — Милтефозин (Импавидо, Паладин — Канада). Курс не менее 28 дней по 100 мг/сут [23; 117].

3. Антибактериальные препараты: мнн — Амфотерицин В (хорошо зарекомендовал себя липосомальный препарат «АмБисом», назначаемый по схеме: 3–5 мг/кг — суточная доза, путем инфузии, в течение 3–6 дней до суммарной дозы 18–21 мг/кг [25; 111; 118]; Паромомицин (Индия) паромомицином [24; 40; 22; 115; 39]. Препараты специфического воздействия на лейшманий.

4. Противопротозойное средство (Аминохинол) — по 0,2 г 3 раза в день, на курс — 11-12 г препарата. Средство считается токсичным. [103; 93].

5. Препараты не специфического, вспомогательного действия: антисептики (синтомицин, мирамистин, бриллиантовый зеленый и пр.); средства, действие которых направлено на борьбу с присоединившейся вторичной инфекцией [6; 18].

Были попытки использования иммунорегуляторных пептидов (тактивин, тималин) и протеолитических ферментов (трипсин), сокращающих продолжительность лечения специфическими препаратами и уменьшающих площадь кожного поражения. Существуют различные схемы лечения: тактивин и тималин в виде монотерапии, тактивин и тималин в сочетании с мономицином, мономицин с трипсином, комбинированное применение тактивина или тималина с трипсином и мономицином [15].

В связи с этим ценными являются публикации авторов, лечивших больных ЗКЛ антибиотиками различных фармакологических групп [61]. Это доксициклин [32; 36; 35; 31; 68; 100] и цефотаксим (клафоран – цефалоспорины 3 поколения) [37].

Универсальным препаратом для лечения лейшманиозов являются препараты 5-валентной сурьмы [71], однако он весьма токсичен [34; 55].

Важной особенностью кожного лейшманиоза является то, что поражения кожи обычно разрешаются без медицинского вмешательства. Высыпания, вызванные *Leishmania major*, проходят в течение 6-12 месяцев, а *Leishmania tropica* – в течение двух лет. Поэтому в легких случаях, в зависимости от предпочтений пациента, можно подождать, когда заболевание пройдет самостоятельно [38; 27]. Лечение может ускорить выздоровление и уменьшить образование рубцов [59].

Из вышеописанного можно сделать вывод, что для лечения лейшманиоза нет единого универсального и вместе с тем эффективного и безопасного способа терапии [57; 58]. Перед практикующим врачом остро стоит вопрос о выборе метода лечения кожного лейшманиоза.

1.3. Новые аспекты этиопатогенеза кожного лейшманиоза (о вирусе, состоянии иммунитета, экспериментальных исследованиях в данном направлении).

Исследования, проведенные зарубежными специалистами, свидетельствуют, что этиологическим фактором заболевания могут являться не сами лейшмании, а вирус, находящийся в них (LRV – лейшманиальный РНК-вирус). Он впервые обнаружен в 1988 г. у больного, инфицированного *L. guyanensis* [75]. Позднее его обнаружили в *L. braziliensis* и указали на связь с более тяжелым течением КЛ вплоть до развития кожно-слизистого лейшманиоза [76; 47]. Авторами установлена корреляция между наличием вируса и иммунным ответом хозяина, что

может служить прогностическим критерием тяжести лейшманиоза и распространения инфекции по лимфатической системе [16; 47]. Геномные нуклеиновые кислоты LRV экстрагировали из 50 культивируемых изолятов, принадлежащих к видам *L. major*, *L. tropica* и *L. infantum*. Определена частичная последовательность генов их вирусной РНК-полимеразы. Далее эти гены попытались обнаружить в образцах изолятов, хранящихся в базе данных GenBank. Их наличие подтверждено в двух изолятах – от пациента, резистентного к терапии меглумаина антимономатом, от песчанки *Rhombomys opimus* [77]. Доказано различие геномных последовательностей вирусов в лейшманиях Нового и Старого Света. Гистологические исследования свидетельствуют, что наличие лейшманий в тканях слизистой оболочки больных не всегда сопровождается их патологией. Назначение препаратов сурьмы, разрушающих паразитов, приводит к распространению инфекции [81; 43; 53; 60]. По сути, мы имеем дело с эндоцитобиозом вируса внутри лейшманий. Лейшманиями, содержащими LRV, и безвирусными паразитами заражали хомяков. Доказано, что в первом случае имел место сильный воспалительный ответ за счет повышения уровня IFN- β . Установлено продление выживаемости паразитов с вирусом [50; 51; 78].

Механизмы потенциала развития лейшманиоза в организме в настоящее время неизвестны. При этом связь с иммунитетом и средой хозяина, а также различных филогенетических факторов паразитов и начало инфекционного процесса очевидна. До сих пор нет консенсуса относительно того, какой из этих факторов необходим для более агрессивного течения. Противоречивые доказательства, вероятно, свидетельствуют о том, что этот процесс является многофакторным и зависит от сложных взаимодействий между паразитом, хозяином и окружающей средой, включая генетические и негенические факторы [81].

Географические границы остаются самым четким разграничением в симптоматике заболевания, и поскольку они параллельны специфическим

эндемическим регионам паразитов, часто считается, что поражение болезни связано с филогенезом паразитов. До сих пор сравнительный анализ геномов *Leishmania spp.*, вызывающих кожный, висцеральный и кожно-слизистый лейшманиоз, не выявил универсальный «метастатический ген» [87; 85; 86].

Например, известно, что метастатический ген *L. braziliensis* несет дополнительные копии NADPH-зависимой фумаратредуктазы и гомолога глутатионпероксидазы. Все они являются важными ферментами при детоксикации окислительного стресса. Неизвестно, имеют ли они какое-либо физиологическое значение.

Интересно, что начало пост-кала-азар связано с успешным лечением висцерального лейшманиоза [53; 54]. Проведенная терапия и иммунный ответ пациента приводят к гибели лейшманий и разрешению симптомов заболевания [44; 88]. Антимониальная терапия несет определенный риск развития пост-кала-азар. Действительно, высокий уровень IL-10 в сыворотке и активированный IL-6 и TNF- α являются прогностическими и важными для развития пост-кала-азар [91; 89; 90]. Эти высокие уровни локальных воспалительных маркеров могут быть компенсирующими для неисправного сигнального пути IFN- γ , потому что хотя уровни интерлайн-IFN- γ высоки, его сигнализация, по-видимому, искажается низкой экспрессией рецептора IFN- γ [92]. Таким образом, этиопатогенезе кожного лейшманиоза важную роль играют сами лейшмании, LRV, состояние иммунной системы организма хозяина. Не исключено, что резистентность к специфической терапии обусловлена наличием LRV. Это послужило основанием для изучения в доклиническом исследовании эффективности комбинированной терапии с включением противовирусного препарата – интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный раздел работы выполнен в Институте медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Первого МГМУ им. И. М. Сеченова.

Анализ данных литературы (см. обзор литературы) по оценке специфической активности препаратов для лечения лейшманиоза позволил отобрать для эксперимента препараты, используемые для этой цели и зарегистрированные на Российском рынке. Изучали активность нескольких лекарственных препаратов: доксициклина (Россия), цефотаксима (клафорана, Франция), цефтриаксона (Россия). Хотя доксициклин используется некоторыми авторами для лечения КЛ у людей, но экспериментальные работы по изучению его активности *in vitro* и *in vivo* в доступной литературе отсутствуют. Выбор цефотаксима (клафорана, цефалоспорины III поколения) базируется на данных, свидетельствующих об эффективности препарата при лечении больных с висцеральным лейшманиозом и с КЛ [37]. Учитывая, что цефотаксим (клафоран) – импортный препарат (Франция), то для исследования с целью импортозамещения нами взят отечественный антибиотик из той же группы – цефтриаксон. Выбор интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона) обусловлен новыми данными об этиопатогенезе лейшманиоза.

Для выполнения поставленных задач применены следующие методы исследования.

1. *Выбор лабораторной модели животного.* В данном исследовании в качестве лабораторной модели использовались золотистые хомяки – *Golden Syrian hamster* (GSH). Они являются классической моделью висцерального лейшманиоза, что обусловлено высокой

восприимчивостью к заболеванию [42; 30]. Их выбор был обусловлен и тем, что нами использована лабораторная культура *L. major*, хранившаяся долгое время в криобанке института. Это требовало выбора более чувствительной экспериментальной модели для заражения. Животные закупались в питомнике лабораторных животных «Пушино», имели ветеринарный паспорт, содержание и питание соответствовали нормативным документам. Заражение животных в эксперименте *in vivo* выполнялось на животных 2-х месячного возраста, масса которых была около 30 г. Клинические проявления заболевания возникали значительно позже, когда масса животных увеличивалась до 100 г. и более. Именно эти животные участвовали в эксперименте по оценке эффективности выбранных нами антилейшманиальных препаратов. Все исследовательские работы с лабораторными животными выполняются в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в организации-производителе исследований, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) (Strasbourg, 1986).

2. *Отбор биологического материала для заражения лабораторных животных.* Для этой цели использован материал, хранящийся в криобанке Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Первого МГМУ им. И. М. Сеченова.

По журналу отбирались наиболее вирулентные штаммы *L. major*. Наращивание биомассы проводилось в течение 8 дней на питательной двухфазной среде. В качестве твердой фазы был взят кровяной агар NNN (Novy-Neal-Nicolle). Жидкой фазой служила смесь среды 199 и 0.5% раствора гидролизата лактальбумина. Для подсчета числа промастигот

использовали камеру Горяева. С помощью формулы $x \times 50 \times 1000$ определяли число паразитов в 1 мл двухфазной среды, где x – суммарное число промастигот в пяти квадрантах, просмотренных по диагонали. Учитывалась и степень подвижности жгутиковых протистов: «-» о – неподвижные лейшмании; «+» – малоподвижные лейшмании, зачастую движения только жгутика, без передвижения; «++» – активные лейшмании, передвигающиеся по всему полю зрения свободно. Биомасса считалась годной для проведения исследований при среднеарифметической численности промастигот в поле зрения 72, что соответствовал 28000000 паразитов в 1 мл двухфазной среды.

3. *Изучение специфической активности препаратов для лечения кожного лейшманиоза in vitro.* Для проведения лабораторных исследований использована культура *L. major*, полученная от больных, проживавших в эндемичных по КЛ регионах Узбекистана. Возбудитель выделялся путем аспирации из очага инфекции и хранившаяся в криобанках института. Для оценки специфической активности препаратов *in vitro* использовали методику, описанную в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией проф. А. Н. Миронова (2012).

Увеличение минимальной концентрации в несколько раз (максимальная доза) дало возможность выяснить влияние концентрации препаратов на специфическую противолейшманиальную активность. Данная серия опытов повторялась трижды. В итоге специфическая активность препаратов каждой концентрации *in vitro* определялась в 15 образцах.

4. *Изучение токсичности противолейшманиальных препаратов:* доксициклина, цефотаксима (клафорана), цефтриаксона, меглумина антимоноата – препарата 5-валентной сурьмы (глюкантима) и интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона). Для этой цели использовали методику описанной в «Руководстве по проведению

доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией проф. А. Н. Миронова (2012) с коррекцией на имеющиеся разрешения для использования этих препаратов в клинической практике. Были отобраны по 5 золотистых хомяков для каждого изучаемого препарата. Суточная терапевтическая концентрация препаратов определялась максимальной концентрацией, рекомендованной инструкцией фирмы производителя для человека со среднестатистическим весом 60 кг для внутримышечного введения и соответствовала таковой, используемой в медицинской практике. Для золотистого хомяка эта доза определялась на 100 г массы тела. Осуществляли последовательное увеличение концентрации изучаемых антибактериальных препаратов в 5 и 10 раз, меглумина антимоноата – в 3 и 5 раз, интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона) – в 10 и 20 раз. Максимальный период наблюдения за животными при изучении токсичности препаратов составил 3 недели. Токсичность препарата оценивалась по изменению массы тела животных на 16 и 21 дни эксперимента по сравнению с исходной. Учитывались их поведенческие реакции и изменение аппетита. Критическим исходом являлся смертность животного.

5. *Изучение эффективности препаратов in vivo на лабораторной модели ЗКЛ* включало несколько этапов.

5.1. Подготовка инфекционного материала для заражения. Экспериментально КЛ на лабораторной модели воспроизводили промастиготами лейшманий, т.к. это более близко к естественному инфицированию. Промастиготы культивировали в питательных средах (см. выше) и дозировали под контролем камеры Горяева. Заражение осуществлялось культуральными формами высоковирулентных штаммов *L. major*, выделенных из язв человека или грызунов эндемичных территорий и хранившихся в криобанке Института. Учитывался факт возможности утраты вирулентности промастигот в процессе длительного

культивирования на искусственных питательных средах. Для сохранения оптимальной вирулентности биомассы *L. major* проводился однократный пассаж возбудителей на питательных средах. Культуру лейшманий выращивали при температуре 20–25°C на среде NNN. Для заражения использовали 10-14 дневную культуру. Взвесь для инфицирования животных являлась годной при концентрации паразитов 10^6 в 0,05 мл.

5.2. Выбор адекватной модели животного. В качестве экспериментальной модели для исследования противолейшманиальной активности лекарственных препаратов *in vivo* использовали золотистых хомяков, как наиболее восприимчивых животных к данной инфекции в природных условиях [30]. Выбор данных животных был актуален и в связи с тем, что мы использовали лабораторную культуру *L. major*, хранившуюся долгое время в криобанке института. Это требовало выбора более чувствительной экспериментальной модели для заражения. Методика была согласована с ведущими лейшманиологами РФ, работающими в Институте медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Е. Н. Понировским и М. В. Стрелковой. Работа соответствует конституции РФ, правилам и нормам (законам, стандартам, распоряжениям, актам и т.п.) национального и международного законодательства, касающегося использования животных в научных исследованиях. Эксперименты проводились на самцах золотистых хомяков 2-х месячного возраста. Их масса составляла около 30 г.

5.3. Методика введения инфекционного агента. Каждому животному путем внутрикожной инъекции вводили около 2 млн. паразитов в виде суспензии культуры *L. major*. Инъекции делали в две области: пах (минимальный волосяной покров) и уши (наиболее частый очаг заражения животных в природных условиях). Это увеличивало вероятность развития инфекционного процесса в коже и давало возможность получить

многоочаговый процесс. При введении препаратов в кожу обязательным условием являлось появление в месте инъекции «лимонной корочки».

5.4. Критерии отбора хомяков для эксперимента *in vivo*. Основным критерием являлась степень местного поражения кожи, которая определялась по специальной шкале: «0» – отсутствие поражения; «+» – инфильтрация; «++» – изъязвление; «+++» – образование язвы с коркой; «++++» – обширная язва; «++» – затихание процесса, начало эпителизации; «+» – дальнейшее заживление, сопровождающееся шелушением; «0» – полная эпителизация.

5.5. Визуальная оценка эффективности препаратов по динамике кожного процесса. Для этого использовали животных при степени местного поражения «+++» и «++++». Рассчитывался средний показатель поражения кожи в каждой группе до начала лечения и после завершения курса терапии. Он равнялся сумме всех крестов в группе, деленной на число животных в ней. Учитывался размер язв, который определялся измерением ее длины и ширины с последующим вычислением площади очага поражения в см² по формуле: $S = \frac{1}{2} D \times \frac{1}{2} d \times \pi$, где D – длина большой оси эллипса, d – длина малой оси эллипса, $\pi = 3,14$. Сумма площадей отдельных язв, деленная на число животных в группе, составляет средний размер лейшманиомы для этой группы животных. Дополнительным критерием являлась глубина поражения, которая регистрировалась в специальном журнале учета. Степень местного поражения и площадь пораженного участка определяют каждую неделю.

5.6. Микроскопическая оценка эффективности лечения по элиминации возбудителя из очагов поражения на коже. Для этого проводили подсчет количества лейшманий в мазках. Для этого использовалась схема: «0» – отсутствие лейшманий; «+» – 1 лейшмания на 1–9 полей зрения; «++» – от 2 до 10 лейшманий в 1-м поле зрения; «+++» – от 11 до 50 лейшманий в 1-м поле зрения; «++++» – более 50 лейшманий в 1-м поле зрения. Наличие

лейшманий в отделяемом язвы и ее периферических тканях, где имелось воспаление, проводили 2 раза в месяц. Отрицательным результатом считалась гибель животного в ходе эксперимента.

5.7. Проводилась фоторегистрация динамики клинических проявлений на коже животных. Обязательным являлось фоторегистрация кожного дефекта до начала лечения, на 30-й и на 60-й дни от начала лечения.

6. *Статистическая обработка материала.* Обработка результатов исследования проведена с использованием пакета статистических программ «STATISTICA 6.0». Данные шифровали в программе EXCEL. Описательная статистика количественных признаков представлена средними и среднеквадратичными отклонениями (в формате $M \pm m$). Для анализа нормально распределенных признаков применялись параметрические методы (t-критерий Стьюдента).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование эффективности препаратов для терапии зоонозного кожного лейшманиоза *in vitro*

Для проведения лабораторных исследований использовалась культура *L. major*, полученная от больных путем аспирации из очага инфекции и хранившаяся в криобанках института. Для оценки специфической активности препаратов использовали методику, описанную в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией проф. А. Н. Миронова (2012). Наращивание биомассы проводилось в течение 8 дней на питательной двухфазной среде. В качестве твердой фазы был взят кровяной агар NNN (Novy-Neal-Nicolle). Жидкой фазой служила смесь среды 199 и 0,5% раствора гидролизата лактальбумина. Для подсчета числа промастигот использовали камеру Горяева.

Изучали активность трех антибактериальных препаратов:

- Цефотаксим (Клафорана, Франция)
- Цефтриаксон (Россия)
- Доксциклин (Россия).

Возбудители разных нозологических форм лейшманиозов имеют большое морфологическое сходство. В жизненном цикле лейшманий имеются две стадии развития. Одна из них развивается в организме млекопитающих как внутриклеточный паразит моноцитарных клеток кожи (кожные формы инфекции) и внутренних органов (печень, селезенка, костный мозг и др.) при висцеральном лейшманиозе. Это лейшманиальная форма – амастигота. Она неподвижна и не имеет жгута. Премастигота (лептомонада или жгутиковая форма) развивается в организме москита, переносчика данной группы инфекции, а также в культурах на искусственных питательных средах при

температуре в интервале 20-28° С и в переживающих культурах перитонеальных макрофагов при 37° С.

Культуры лейшманий на кровяных средах поддерживали без применения антибиотиков. Для посева использовали культуры из пробирок, при этом в контрольные пробирки вносили чистую среду, а в опытные пробирки вносили среду, в которую предварительно добавили суспензию промастигот лейшманий. Эту смесь разливали по мини-пробиркам в объеме 0,47 мл, затем в каждую опытную пробирку вносили двукратные разведения испытуемых веществ, в объеме 0,03 мл. Через 5 дней инкубации при 22–25°С в темноте содержимое пробирок исследовали в свежем и окрашенном мазке. Таким образом, определяли минимальную концентрацию препарата, которая полностью подавляет рост промастигот, т.е. лейшманиястатическую концентрацию испытуемого вещества.

Последовательное увеличение концентрации препаратов, в соответствии с методикой, проводилось пошагово – в 2, 4, 6, 8, 10 раз. Разведение порошков лекарственных препаратов осуществлялось в соответствии с инструкцией фирмы производителя к каждому из них. Анализ результатов дан с использованием двух статистически достоверных вариантов концентраций, обозначенных как *min* и *max*.

Важно отметить, что у меглумина антимоноата (меглумина антимоноата) увеличение концентрации проводилось также пошагово, однако в связи с тем, что меглумина антимоноат выпускается в виде раствора, то увеличение концентрации в 6, 8 и 10 раз привело бы к излишнему объему в испытуемых пробирках, что обуславливало автоматически увеличение объема препарата. Поэтому увеличение концентрации меглумина антимоноата (МА) проводилось только в 2 и 4 раза (рисунок 1).

МА, г		
последовательное увеличение дозы в 2 и 4 раза		
0,009	0,018	0,036

Рисунок 1 – Дозы меглумина антимоноата, последовательно увеличиваемые для изучения противолейшманиальной эффективности *in vitro*

Контрольные группы:

- 1 группа – пробирки с жидкой средой 199 с солями Хенкса (требования протокола).
- 2 группа – учитывая, что препарат пентавалентной сурьмы – глукантим (Франция), длительное время являлся «золотым стандартом» при лечении любых форм лейшманиоза, его использовали в качестве стандарта.

Для испытуемых антибактериальных препаратов (МНН – доксициклин, цефотаксим, цефтриаксон) разница минимальной и максимальной концентрациями составила в 10 раз. Данная серия опытов повторялась трижды. В итоге специфическая активность препаратов каждой концентрации *in vitro* определялась в 18 образцах. Подсчет паразитов производился с помощью камеры Горяева.

Использовалась формула: $БМ = a \times 50 \times 1000$, где БМ (биомасса) – искомое число паразитов, а – суммарное число промастигот в пяти квадрантах, просмотренных по диагонали.

Биомасса считалась годной для проведения исследований при среднеарифметической численности промастигот в поле зрения 72, что соответствовал 28000000 паразитов в 1 мл двухфазной среды.

Учитывалась и степень подвижности жгутиковых протистов: «-» – неподвижные лейшмании; «+» – малоподвижные лейшмании, зачастую движения только жгутика, без передвижения; «++» – активные лейшмании, передвигающиеся по всему полю зрения свободно.

3.1.1. Результаты исследования эффективности доксициклина *in vitro*

Для изучения эффективности доксициклина *in vitro* его доза min 0,0006 г (по инструкции фирмы производителя) последовательно увеличивалась в 2, 4, 6, 8, 10 раз (рисунок 2).

Опытная группа – доксициклин, г					
последовательное увеличение дозы в 2, 4, 6, 8, 10 раз					
Min 0,0006	0,0012	0,0024	0,0036	0,0048	Max 0,006

Рисунок 2 – Дозы доксициклина, последовательно увеличиваемые для изучения противолейшманиальной эффективности *in vitro*

Проведено сравнение эффективности минимальной (0,0006 г) и максимальной (0,006 г) доз доксициклина с двумя контрольными группами – меглумина антимоноат и питательная среда 199 (рис. 3).

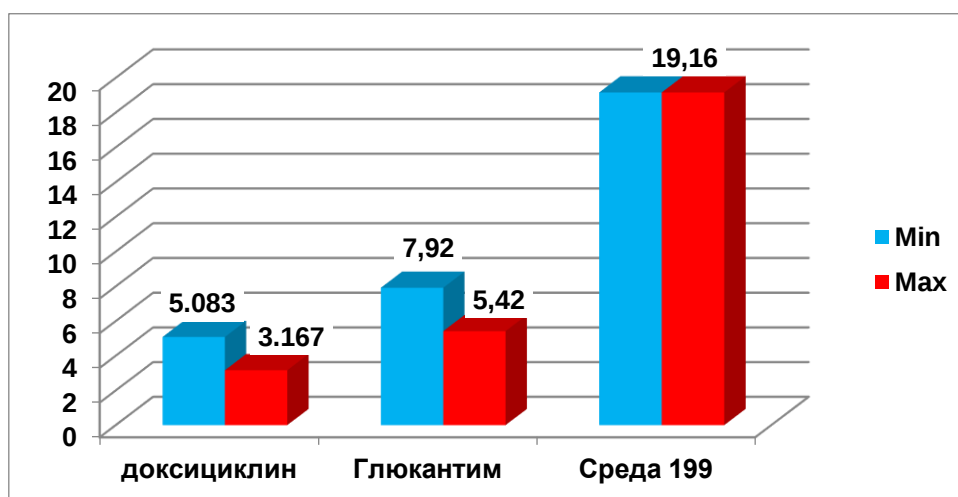


Рисунок 3 – Сравнение эффективности min (0,0006 г) и max (0,006 г) доз доксициклина с таковым у меглумина антимоноата (1-я контрольная группа) и питательной средой 199 (2-я контрольная группа) (по вертикальной оси – число промастигот в одном поле зрения, абс.)

Сравнение числа промастигот (5,083) в трех пробирках с минимальными дозами препаратов: доксициклина (0,0006 г) и меглумина антимоноата (7,92 при минимальной дозе 0,009 г) свидетельствует, что специфическая активность доксициклина в 1,6 раза выше, чем традиционно используемого специалистами меглумина антимоноата (5,083 против 7,92 промастигот в одном поле зрения) ($p < 0,05$).

Сравнение числа промастигот (3,167) в трех пробирках с максимальными дозами препаратов: доксицилина (0,006 г) и меглума антимоноата (5,42 при максимальной дозе 0,036 г) свидетельствует, что специфическая активность доксицилина достоверно в 1,7 раза выше, чем у меглума антимоноата (3,167 против 5,42 промастигот в одном поле зрения) ($p < 0,05$).

В контрольных пробирках с 0,03 мл среды 199 число промастигот несколько уменьшилось по сравнению с исходным значением за счет естественной гибели паразитов вследствие отсутствия пассажей и твердой фазы питательной среды.

Увеличение минимальной терапевтической дозы доксицилина в 10 раз лишь в 1,6 раза увеличивает его эффективность (5,083 против 3,167 промастигот в одном поле зрения). Отсутствие подвижных форм промастигот указывает на ингибирующую активность препарата. При использовании, как минимальных, так и максимальных доз доксицилина, подвижные формы не выявлены. Это является прямым доказательством эффективности минимальной дозы препарата, которая обладает высокой ингибирующей активностью.

3.1.2. Результаты исследования эффективности цефотаксима (клафорана) *in vitro*

Для изучения эффективности цефотаксима *in vitro* его доза min 0,0075 г (по инструкции фирма производителя) последовательно увеличивалась в 2, 4, 6, 8, 10 раз (рисунок 4).

Опытная группа – цефотаксим					
последовательное увеличение дозы в 2, 4, 6, 8, 10 раз					
0,0075	0,015	0,03	0,045	0,06	0,075

Рисунок 4 – Дозы цефотаксима, последовательно увеличиваемые для изучения
противолеишманиальной эффективности *in vitro*

Проведено сравнение эффективности минимальной (0,0075 г) и максимальной (0,075 г) доз цефотаксима с двумя контрольными группами – меглума антимоноат и питательная среда 199 (рис. 5).

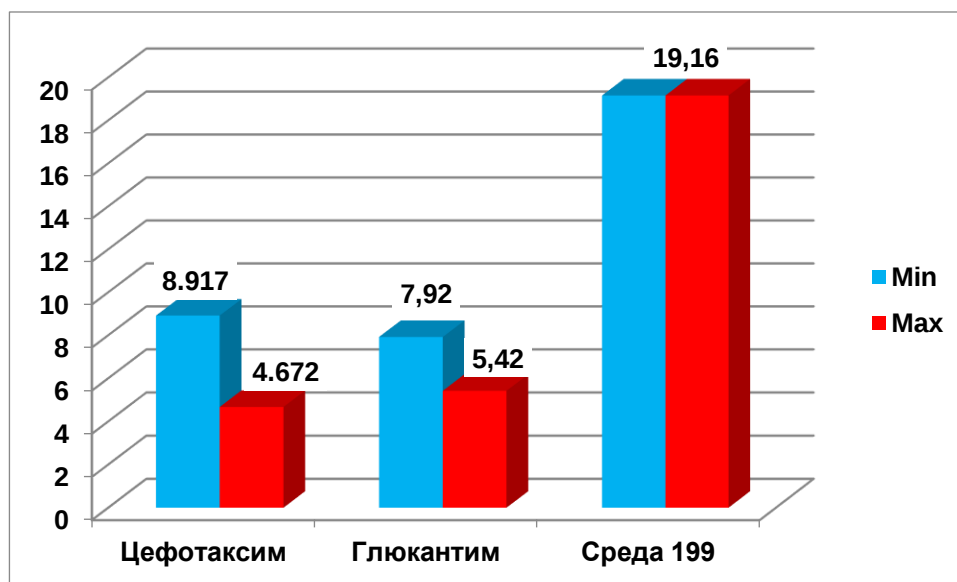


Рисунок 5 – Сравнение эффективности минимальных (0,0075 г) и максимальных (0,075 г) доз цефотаксима с таковым у меглума антимоноата (1-я контрольная группа) и питательной средой 199 (2-я контрольная группа) (по вертикальной оси – число промастигот в одном поле зрения, абс.)

Сравнение числа промастигот в трех пробирках с минимальными дозами препаратов: цефотаксима (минимальная доза 0,0075 г) и меглума антимоноата (минимальная доза 0,009 г) свидетельствует, что специфическая активность цефотаксима только в 1,13 раза больше, чем у традиционно используемого специалистами меглума антимоноата (соответственно, 8,917 против 7,92 промастигот в одном поле зрения) ($p > 0,05$).

Сравнение числа промастигот в трех пробирках с максимальными дозами препаратов: меглума антимоноата (0,036 г) и цефотаксима (0,075 г) свидетельствует, что наоборот специфическая активность меглума антимоноата только в 1,16 раза выше, чем у цефотаксима (5,42 против 4,672 промастигот в одном поле зрения), что опять же статистически недостоверно

($p > 0,05$). Таким образом, и при минимальных и при максимальных дозах специфическая активность обоих препаратов практически идентична.

Увеличение минимальной терапевтической дозы цефотаксима в 10 раз в 1,9 раза увеличивает его эффективность (8,917 против 4,672 промастигот в одном поле зрения). Отсутствие подвижных форм промастигот отмечается лишь при максимальной дозе, увеличенной в 10 раз от рекомендованной инструкцией. Это указывает на необходимость проверки безопасности этой дозы в исследовании *in vivo*.

3.1.3. Результаты исследования эффективности цефтриаксона *in vitro*

Для изучения эффективности цефтриаксона *in vitro* его доза минимальная 0,009 г (по инструкции фирма производителя) последовательно увеличивалась в 2, 4, 6, 8, 10 раз (рисунок 6).

Опытная группа – цефтриаксон					
последовательное увеличение дозы в 2, 4, 6, 8, 10 раз					
Min 0,009	0,018	0,036	0,054	0,072	Max 0,09

Рисунок 6 – Дозы цефтриаксона, последовательно увеличиваемые для изучения противолейшманиальной эффективности *in vitro*

Проведено сравнение эффективности минимальной (0,009 г) и максимальной (0,09 г) доз цефтриаксона с двумя контрольными группами – меглумина антимононат и питательная среда 199 (рис. 7).

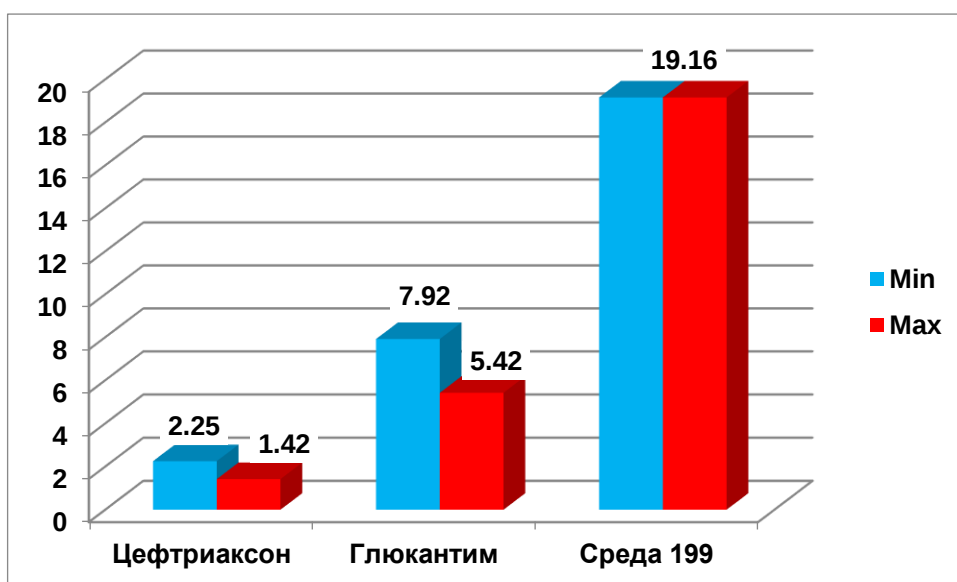


Рисунок 7 – Сравнение эффективности минимальной (0,009 г) и максимальной (0,09 г) доз цефтриаксона с таковым у меглума антимоноата (1-я контрольная группа) и питательной средой 199 (2-я контрольная группа) (по вертикальной оси – число промастигот в одном поле зрения, абс.)

Сравнение числа промастигот (2,25) в трех пробирках с минимальными дозами препаратов: цефтриаксона (0,009 г) и меглума антимоноата (0,009 г) свидетельствует, что специфическая активность цефтриаксона достоверно в 3,5 раза выше, чем у традиционно используемого специалистами меглума антимоноата (2,25 против 7,92 промастигот в одном поле зрения) ($p < 0,05$).

Сравнение числа промастигот в трех пробирках с максимальными дозами цефтриаксона (0,09 г) и меглума антимоноата (0,036 г) свидетельствует, что специфическая активность цефтриаксона достоверно в 3,8 раза выше, чем у меглума антимоноата (1,42 против 5,42 промастигот в одном поле зрения) ($p < 0,05$).

Увеличение минимальной терапевтической дозы цефтриаксона в 10 раз лишь в 1,6 раза увеличивает его эффективность (2,25 против 1,42 промастигот в одном поле зрения). Отсутствие подвижных форм промастигот указывает на ингибирующую активность препарата. При использовании, как минимальных, так и максимальных доз цефтриаксона, подвижные формы не выявлены. Это

является прямым доказательством эффективности минимальной дозы препарата, которая обладает высокой ингибирующей активностью.

3.1.4 Сравнительный анализ эффективности препаратов для лечения зоонозного кожного лейшманиоза *in vitro*

Для сравнительного анализа эффективности антибактериальных препаратов с учетом контрольных групп, данные о *min* и *max* терапевтической концентрации для каждого из выбранных антибиотиков во взвеси паразитов, обладающие ингибирующей активностью, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – *Min* и *max* терапевтические концентрации антибиотиков во взвеси паразитов, обладающие ингибирующей активностью

МНН	Доза, г	Лейшмании в одном поле зрения	
		Количество промастигот	Подвижность Промастигот*
Доксициклин	<i>Min</i> 0,0006	5,083	-
	<i>Max</i> 0,006	3,167	-
Цефтриаксон	<i>Min</i> 0,009	2,250	-
	<i>Max</i> 0,09	1,420	-
Цефотаксим	<i>Min</i> 0,0075	8,917	+
	<i>Max</i> 0,075	4,672	-
Меглумина антимоноата	<i>Min</i> 0,009	7,920	++
	<i>Max</i> 0,036	5,420	++
Контроль	Среда 199	19,160	++

* Использовались обозначения: «-» - неподвижные лейшмании; «+» - малоподвижные лейшмании, зачастую движения только жгутика, без передвижения; «++» - активные лейшмании, передвигающиеся по всему полю зрения свободно.

Таблица 3 – Подвижность промастигот при использовании *Min* и *Max* доз
противолеишманиальных препаратов

Доза	Подвижность просмастигот				
	Доксициклин	Цефотаксим	Цефтриаксон	Меглумина антимоната	Среда 199
Min	-	+	-	++	++
Max	-	-	-	++	

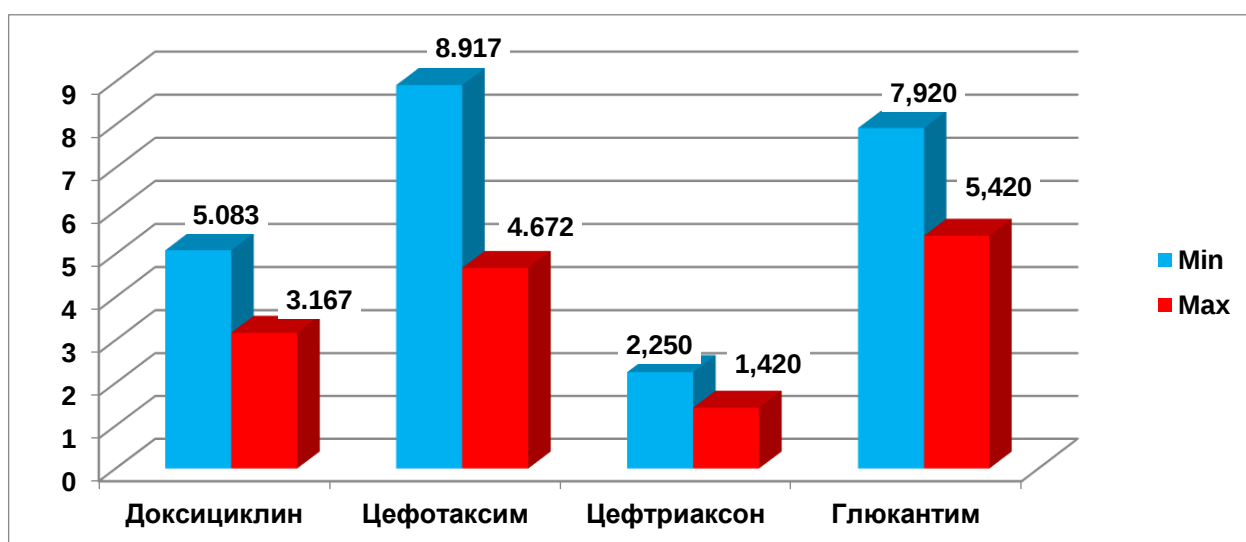


Рисунок 8 – Сравнение эффективности минимальных и максимальных (0,09 г) доз препаратов между собой

Данные рисунка 8 свидетельствуют, что ингибирующая активность антибактериальных препаратов при минимальной дозе составляла 2,25 (цефтриаксон); 5,083 (доксциклин); 8,917 (цефотаксим) промастигот в поле зрения. Она уменьшалась от препарата к препарату в 2,3 и 1,8 раза. В то же время инактивация подвижности промастигот наступала при дозе доксициклина в 15 раз меньшей, чем цефтриаксона (0,0006 г против 0,009 г,

соответственно). Существенно, что в этих группах все визуализируемые особи были неподвижными при минимальных дозах. При минимальной дозе цефотаксима (8,917) ингибирующей активности была слабой, т.к. присутствовали малоподвижные лейшмании с небольшим колебанием жгутика.

Сравнение двух контрольных групп свидетельствует, что в 1-ой контрольной группе с использованием меглумина антимоноата минимальная ингибирующая активность препарата составляла 7,92 жгутиковых в поле зрения, что в только в 2,2 раза меньше, чем во 2-ой контрольной группе (среда 199 – 19,16). При этом имели место активные лейшмании, передвигающиеся свободно по всему полю зрения. Не исключено, что это связано с несколько заниженной концентрацией меглумина антимоноата в связи с использованием его жидкой лекарственной формы. Эксперимент *in vivo* даст возможность получить более достоверные данные.

Увеличение терапевтической концентрации препаратов в 4 (меглумина антимоноат) и в 10 раз (антибиотики) свидетельствует о незначительном повышении специфической активности: только в 1,5 раза для меглумина антимоноата (5,42 против 7,92); 1,6 раза для доксициклина (3,167 против 5,083); в 1,5 раза для цефтриаксона (1,42 против 2,25) и в 1,9 раза для цефотаксима (4,672 против 8,917). С другой стороны, увеличение терапевтической концентрации в клинической практике не рекомендуется и не оправдано, т.к. минимальная концентрация уже обладает ингибирующей активностью.

3.2. Проверка на лабораторной модели токсичности препаратов с противолейшманиальным эффектом, доказанным *in vitro*

Для изучения токсичности указанных препаратов использовали методику, принятую в клинической фармакологии для доклинических исследований на животных [30]. Для этой цели отобраны по 5 золотистых хомяков для каждого изучаемого препарата: доксициклина, цефотаксима (клафорана) и цефтриаксона, а также меглума антимоноата – препарата 5-валентной сурьмы (глюкантима) и интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона).

Доза препаратов рассчитывалась исходя из максимальной рекомендуемой дозы в соответствии с инструкцией фирмы производителя для человека со среднестатистическим весом 60 кг. Для золотистого хомяка эта доза определялась на 100 г массы тела. Максимальный период наблюдения за животными при изучении токсичности препаратов составил 3 недели.

Максимальная терапевтическая доза доксициклина составила 0,00033 г на 100 г массы животного. Препарат вводили внутримышечно однократно в дозировках, превышающих максимальную в 5 раз (1 и 2 животные), а также – в 10 раз (3-5 животные) (табл. 4).

Таблица 4 – Оценка токсичности доксициклина *in vivo* на золотистых хомяках

№ GSH и разведение доксициклина	Количество препарата на 100 г модели (г)*	Количество вещества, введенного в/м (г)	Масса модели (г)		
			1 день	16 день	21 день
№ 1 в 5 раз	0,0016	0,0014	90	93 (+3,3%)	94 (+4,4%)
№ 2 в 5 раз	0,0016	0,0016	103	106 (+3%)	108 (+5%)
№ 3 в 10 раз	0,0032	0,0033	102	102 (0%)	105 (+3%)
№ 4 в 10 раз	0,0032	0,0036	111	116 (+4,5%)	120 (+8,1%)
№ 5 в 10 раз	0,0033	0,004	122	125 (+2,5%)	123 (+1%)

* рекомендованное инструкцией количество препарата в пересчете на 100 г веса лабораторной модели, увеличенное в 5 и 10 раз.

Вес животных до начала эксперимента колебался от 90 до 122 г. После введения дозы доксициклина, превышающей терапевтическую в 5 раз, масса

первого животного увеличилась через 16 дней на 3,3 %, а на 21 день – на 4,4%, а у второго животного – на 3% и 5%, соответственно. Практически аналогичные данные получены при увеличении дозы доксициклина в 10 раз. Спустя 16 дней масса золотистых хомяков, у двух животных увеличилась на 2,5% (№5) и на 4,5% (№4), а у одного (№3) – не изменилась. Через 3 недели прирост массы тела зарегистрирован у всех животных на 1% (№5) – 8,1% (№4). Погибших животных не было. Отмечено лишь небольшое снижение активности поведения.

Полученные данные наглядно свидетельствуют об отсутствии токсичности у доксициклина *in vivo* при повышении терапевтической дозы препараты в 5 и даже 10 раз.

В соответствии с инструкцией максимальная дозировка клафорана составляла 0,0133 г на 100 г животного. Его вводили трем животным в дозировке в 5 раз, превышающей максимальную, а двум – в 10 раз. Препарат вводился внутримышечно однократно.

В таблице 5 приведены результаты экспериментальной оценки токсичности цефотаксима (клафорана) *in vivo* на золотистых хомяках.

Таблица 5 – Оценка токсичности цефотаксима (клафорана) *in vivo* на золотистых хомяках

№ GSH и разведение цефотаксима	Количество препарата на 100г модели (г)*	Количество вещества, введенного в/м (г)	Масса модели (г)		
			1 день	16 день	21 день
№ 1 в 5 раз	0,063	0,082	131	82 (-37,4%)	85 (-35,1%)**
№ 2 в 5 раз	0,064	0,067	104	79 (-24,0%)	76 (-26,9%)**
№ 3 в 5 раз	0,065	0,06	93	71 (-23,7%)	67 (-28,0%)**
№ 4 в 10 раз	0,13	0,172	132	75 (-43,2%) **	-
№ 5 в 10 раз	0,132	0,15	114	74 (-35,1%) **	-

* рекомендованное инструкцией количество препарата в пересчете на 100 г веса лабораторной модели.

** животные, погибшие в ходе эксперимента, масса их определена посмертно.

Вес животных колебался от 93 до 132 г. Экспериментально установлена токсичность цефотаксима (клафорана). При увеличении дозы препарата в 10 раз оба животных (№4 и №5) погибли уже на 16 день. Их посмертная масса

тела была на 43,2% (№4) и 35,1% (№5) меньше исходной. Спустя 3 недели после введения препарата погибли остальные три хомяка, доза введенного препарата у которых, превышала в терапевтическую дозу в 5 раз. Посмертная масса животных была ниже исходной на 26,9% (№2) – 35,1% (№1). Во всех случаях потеря массы тела сопровождалась диареей, снижением аппетита и активности животных.

Полученные данные свидетельствуют о высокой токсичности цефотаксима (клафорана).

В соответствии с инструкцией максимальная дозировка цефтриаксона составляла 0,0067 г на 100 г животного. Его вводили трем животным в дозировке в 5 раз, превышающей максимальную, а двум – в 10 раз. Препарат вводился внутримышечно однократно.

В таблице 6 приведены результаты экспериментальной оценки токсичности цефтриаксона *in vivo* на золотистых хомяках.

Таблица 6 – Оценка токсичности цефтриаксона *in vivo* на золотистых хомяках

№ GSH и разведение цефотаксима	Количество препарата на 100г модели (г)*	Количество вещества, введенного в/м (г)	Масса модели (г)		
			1 день	16 день	21 день
№ 1 в 5 раз	0,033	0,034	102	87 (-14,7%)	47.5 (-53,3%) **
№ 2 в 5 раз	0,034	0,035	103	82 (-20,4%)	55 (-46,6%) **
№ 3 в 5 раз	0,034	0,03	89	76 (-14,6%)	53 (-40,5%) **
№ 4 в 10 раз	0,067	0,076	113	91 (-19,5%)	61 (-46,0%) **
№ 5 в 10 раз	0,067	0,072	107	85 (-20,6%)	51 (-52,4%) **

* рекомендованное инструкцией количество препарата в пересчете на 100г веса лабораторной модели.

** животные, погибшие в ходе эксперимента, масса их определена посмертно

Экспериментально на золотистых хомяках установлена токсичность цефтриаксона. В отличие от клафорана в этой группе, независимо от увеличения дозы в 5 и 10 раз, все хомяки погибли несколько позже – к концу 21 дня. Была зарегистрирована значительная потеря массы тела у всех животных

уже на 16 день (от 14,6% до 20,6%). Их посмертная масса тела к 21 уменьшилась вдвое (40,5%-53,3%). Во всех случаях потеря массы тела сопровождалось диареей, снижением аппетита и активности животных.

В соответствии с инструкцией максимальная дозировка меглумина антимоноата (глюкантима) составила 0,01 г на 100 г массы животного. Препарат вводили внутримышечно однократно в дозировках, превышающих максимальную в 3 раза (животные №1 и №2), а также – в 5 раз (№№3-5) (табл. 8). Увеличение дозы в 10 раз не проводилось, что связано с особенностями лекарственной формы выпуска препарата (раствор). Если дозу увеличить в 10 раз, то животному следовало вводить 3,3 мл меглумина антимоноата, что несоизмеримо с размером животного. С другой стороны, меглумина антимоноата применяется для лечения КЛ много десятилетий и считается «золотым стандартом» терапии.

В таблице 7 приведены результаты экспериментальной оценки токсичности меглумина антимоноата (МА) *in vivo* на золотистых хомяках.

Таблица 7 – Оценка токсичности МА *in vivo* на золотистых хомяках

№ GSH и разведение цефотаксима №	Количество препарата на 100г модели (г)*	Количество вещества, введенного в/м (г)	Масса модели (г)		
			1 день	16 день	21 день
№ 1 в 3 раз	0,034	0,042	122	122 (0%)	121 (-0,8%)
№ 2 в 3 раз	0,031	0,035	111	113 (+1,8%)	119 (+7,2%)
№ 3 в 5 раз	0,048	0,051	107	103 (-3,7%)	97,7 (-8,7%)
№ 4 в 5 раз	0,048	0,047	98	99 (+1%)	104 (+6,1%)
№ 5 в 5 раз	0,047	0,040	85	90 (+5,9%)	88 (+3,5%)

* рекомендованное инструкцией количество препарата в пересчете на 100г веса лабораторной модели, увеличенные в 3 и 5 раз.

При увеличении терапевтической дозы меглумина антимоноата в 3 раза через 16 дней масса тела животных №1 и №2 практически не изменилась. Через 21 день у хомяка №1 она была стабильной, а у №2 – возросла на 7,2%. При увеличении терапевтической дозы в 5 раз через 16 дней у двух хомяков масса

тела увеличилась на 1% (№4) и на 5,9% (№5). У хомяка №3 несколько снизилась – на 3,7%. Спустя 21 день масса животных №4 и №5 нарастала на 6,1% и 3,5%, соответственно. У животного №3 она снизилась на 8,7%, что по сравнению с исходной массой статистически недостоверно ($p < 0,05$).

Таким образом, очередной раз доказано отсутствие токсического действия меглума антимоноата на экспериментальных животных.

В соответствии с инструкцией максимальная дозировка интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона) составляла 10000 МЕ на 100 г животного. Животным №1 и №2 вводили максимальную дозу в 10 раз превышающую максимальную терапевтическую дозу для человека, а трем животным – в 20 раз. Такой подход был связан с желанием экспериментально оценить наличие антилейшманиальной активности у препарата из группы иммуномодуляторов. Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный вводили однократно внутримышечно.

В таблице 8 приведены результаты экспериментальной оценки токсичности интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (ИФ) *in vivo* на золотистых хомяках.

Таблица 8 – Оценка токсичности интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (ИФ) *in vivo* на золотистых хомяках

№ GSH и разведение ИФ	Количество препарата на 100 г модели (МЕ)*	Количество вещества, введенного в/м (МЕ)	Масса модел и (г)	Масса модели (г)	Масса модели (г)
			1 день	16 день	21 день
№1 в 10 раз	101000	91000	90	101 (+12,2%)	107 (+18,9%)
№2 в 10 раз	101000	93000	92	101 (+9,8%)	120 (+30,4%)
№3 в 20 раз	188000	194000	103	114 (+10,7%)	129 (+25,2%)
№4 в 20 раз	195000	219000	112	112 (0%)	114 (+1,8%)
№5 в 20 раз	197000	221000	112	115 (+2,7%)	118 (+5,4%)

* рекомендованное инструкцией количество препарата в пересчете на 100г веса лабораторной модели, увеличенные в 10 и 20 раз.

Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный не оказывает токсического действия на организм экспериментальных животных. Даже при 20-кратном увеличении терапевтической дозы препарата отмечено стабильное увеличение массы тела золотистых хомяков, как через 16 дней (2,7% и 10,7%), так через 21 день (1,8%-25,2%) по сравнению с исходным.

3.3. Исследование эффективности препаратов для терапии зоонозного кожного лейшманиоза *in vivo*

В данной главе представлены результаты изучения сравнительной эффективности противолейшманиальных препаратов в эксперименте на лабораторных животных после воспроизведения у них модели ЗКЛ. Первая серия опытов была посвящена изучению эффективности антибиотиков доксициклина, цефотаксима (клафорана) и цефтриаксона, а также меглумина антимоноата – препарата 5-валентной сурьмы (глюкантима) и интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона) в виде монотерапии. Для изучения эффективности монотерапии перечисленными препаратами использовались лабораторные модели золотистых хомяков по 30 животных в каждой группе.

Вторая серия опытов была посвящена сравнению монотерапии меглумина антимоноатом (повторное исследование) и комбинированной терапии меглумина антимоноатом в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным. Данная серия опытов проведена дважды. Третья серия опытов была направлена на изучение эффективности комбинированной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным. Данная серия опытов также проведена дважды. Во второй и третьей серии опытов использовались лабораторные модели по 12 разнополых золотистых хомяков в каждой группе.

Формирование всех опытных групп проводилось с учетом массы тела животного, однозначности клинических проявлений на коже и длительности

существования язвы. В соответствии с этими показателями лабораторные модели животных были репрезентативными.

В данном исследовании в качестве лабораторной модели использовались золотистые хомяки – классическая модель висцерального лейшманиоза. Они обладают более высокой восприимчивостью к заболеванию. Заражение животных в эксперименте *in vivo* выполнялось на животных 2-х месячного возраста, масса которых была около 30 г. Клинические проявления заболевания возникали значительно позже, когда масса животных увеличивалась до 100 г и более. Именно эти животные участвовали в эксперименте по оценке эффективности выбранных нами антилейшманиальных препаратов. В каждой группе при монотерапии было по 30 животных.

Во второй и третьей сериях опытов, проведенных дважды, использовали лабораторные модели по 12 разнополых GSH в каждой группе (всего по 24 животных). Формирование всех опытных групп проводилось с учетом массы тела животного, однозначности клинических проявлений на коже и длительности существования язвы. В соответствии с этими показателями лабораторные модели животных были репрезентативными.

Для стандартизации опытов использовалось руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств [30].

В качестве возбудителя заболевания использовали промастиготы *L. major*. Заражение животных промастиготами более близко к естественному, так как оно подобно укусу переносчика. Эти формы лейшманий легко культивировать на искусственных питательных средах и дозировать под контролем камеры Горяева. Заражение осуществлялось культуральными формами высоковирулентных штаммов *L. major*, выделенных из язв человека или грызунов, находившихся на хранении в криобанке Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского. Культуру лейшманий выращивали при температуре 20–25°C на среде NNN. Учитывая, что в процессе длительного культивирования

промастигот на искусственных питательных средах вирулентность их утрачивается, использована биомасса после 1-2 пассажей.

Методика заражения патологическим материалом. Для заражения использовали 10-14 дневную культуру. Подсчет промастигот производили в камере Горяева. Затем готовили такую взвесь, которая содержала 10^6 паразитов в объеме 0,05 мл. Эта минимально заражающая доза. Каждому животному однократно единовременно внутрикожно вводили по 2 млн. промастигот в виде суспензии культуры *L. major* симметрично в пах (минимальный волосяной покров) и уши (наиболее частый очаг заражения животных в природных условиях) с образованием эффекта «лимонной корочки».

Методика оценки эффективности испытуемых лекарственных препаратов. Их введение осуществляли на разных стадиях развития инфекции (лечебное исследование). Лечение хомяков начинали после завершения инкубационного периода и трансформации большинства бугорков в язву, обычно спустя месяц и более с момента заражения. Эффективность терапии оценивалась с использованием следующих критериев: 1) динамика кожного процесса 2) размер лейшманиомы; 3) наличие лейшманий в язве; 4) срок клинического выздоровления. Основным критерием отбора животных для начала терапии была клиническая картина лейшманиоза с ярко выраженным кожным процессом, подтвержденным микроскопически – обнаружением амастигот в мазке из очагов поражения.

3.3.1. Клиническая характеристика особенностей течения ЗКЛ при использовании золотистых хомяков в качестве лабораторной модели в эксперименте *in vivo*

Инкубационный период колебался в широких пределах – от 1 до 8 месяцев (табл.9).

Таблица 9 – Продолжительность инкубационного периода ЗКЛ у золотистых хомяков при внутрикожном заражении *L. major*

Продолжительность инкубационного периода	Число животных (N=198)	
	Абс.	%
До 1 месяца	83	41,9
От 1 мес. до 1,5 мес.	18	9,1
От 1,5 до 2 мес.	14	7,1
От 2 мес. до 2,5 мес.	12	6,1
От 2,5 мес. до 3 мес.	10	5,0
От 3 мес. до 3,5 мес.	23	11,6
От 3,5 мес. до 4 мес.	22	11,1
Более 4 мес.	16	8,1

Инкубационный период экспериментального ЗКЛ у хомяков колебался от 1 до 8 месяцев, составляя в среднем $76,8 \pm 21,8$ дня. Более чем у половины животных (58,1%) клинические проявления ЗКЛ возникали в течение 2 мес. с момента заражения, у остальных (41,9%) – спустя 2 мес., в том числе у 1/3 (30,8%) – спустя 3 мес.

Эволюционный полиморфизм морфологических элементов в очаге поражения. Первоначально на месте введения биомассы *L. major* появлялся блестящий бугорок плотной консистенции. В центре его через 5–7 дней возникала язва диаметром 1–2 мм. В дальнейшем она увеличивалась в размере и приобретала характерный для ЗКЛ вид (рисунок 9).



Рисунок 9 – Язва в паху у золотистого хомяка при ЗКЛ

Первоначально язвы в подавляющем большинстве случаев были размером до 4 мм, округлой формы. Имели валикообразно приподнятый край и обширную зону инфильтрата в основании. Со временем размер язв увеличивался до 1 см в диаметре (61,3%), иногда до 2 см (38,7%). По мере некротизации язвы ее дно обильно покрывалось гнойным налетом, и отделялся гнойный экссудат. У трети (52 или 34,7%) хомяков от язв исходил неприятный запах. Нередко экссудат ссыхался в корки, плотно прилегающие к краям язвы. При надавливании на корку по краям язвы выступала серозная жидкость, содержащая большое количество лейшманий. При локализации язв в области паха у животных возникал лимфостаз половых органов (7,6%), что нередко приводило к нарушению передвижения животного.

При локализации язвы на ушных раковинах всегда наблюдалось частичное или полное расплавление хрящевой ткани (рисунок 10).



Рисунок 10 – Язва на ушной раковине у золотистого хомяка при ЗКЛ

Учитывая, что язвы практически всегда имели форму эллипса, то измеряли длину их малой и большой оси. Затем рассчитывали среднюю площадь очагов язвенного дефекта по формуле:

$$S = \frac{1}{2}D \times \frac{1}{2}d \times \pi,$$

где D – длина большой оси эллипса, d – длина малой оси эллипса, $\pi = 3,14$.

Для верификации диагноза делали скарификаты с валикообразного края язвы. Лейшмании в большом числе обнаруживались и в серозной жидкости, получаемой при надавливании на корку. Большое количество расположенных в макрофагах и свободно лежащих лейшманий свидетельствовало о наличии специфического процесса (рисунок 11).

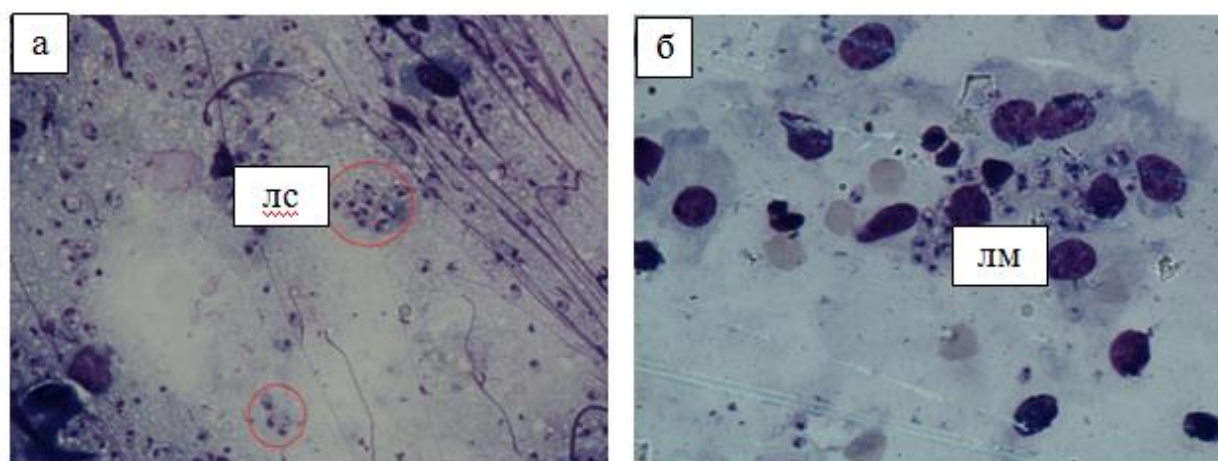


Рисунок 11 – Микроскопическое исследование содержимого скарификата: а – бугорка, б – валикообразно приподнятого края язвы, лм – лейшмании в моноцитах, лс – свободно лежащие лейшмании

При микроскопическом обнаружении лейшманий в очагах поражения животные включались с экспериментальный раздел работы для изучения противолейшманиальной активности препаратов. Сроки наблюдения за животными после введения препаратов составляли 60 дней.

3.3.2. Результаты оценки эффективности лечения меглумина антимоном (глюкантимоном) (контрольная группа) экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков

Для изучения эффективности монотерапии меглумина антимоном на модели ЗКЛ использованы 30 золотистых хомяков. Препарат вводили 1 раз в неделю в дозе 0,03 г на 100 г массы лабораторной модели. Кратность введения препарата зависела от его переносимости. Максимальное число инъекций зависело от результатов клинического выздоровления и составляло 6-7. Средняя масса лабораторной модели в данной серии опытов составила $107,8 \pm 1,7$ г.

При лечении меглумина антимоном экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков смертности животных не зарегистрировано. В течение первых 2 недель отмечено снижение активности животных, потеря аппетита и

незначительное уменьшение массы тела. Однако впоследствии состояние животных стабилизировалось.

Результаты оценки эффективности монотерапии меглума антимоном у золотистых хомяков (N=30) представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты оценки эффективности монотерапии меглума антимоном (глюкантимоном) ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30)

Дни наблюдения	Масса лабораторной модели (г)	Средний размер язв (см ²)	Степень местного поражения (0/+)	Микроскопия/ число лейшманий (0/+) *
До начала лечения	107,8±1,7	0,6	3,2±0,7	3,5±0,4
30-ый день после начала терапии	109,3±1,6	0,06	1,2±0,7	1,5±0,5
60-ый день после начала терапии	112,8±1,6	0	0,1±0,03	0,6±0,6
Срок клинического выздоровления (дни)	40,7±3,2			

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

Выздоровление животных происходило в течение 2 мес., в среднем за 40,7±3,2 дня. На 30-ый день после начала введения меглума антимоном снижения массы тела животных не зарегистрировано, средняя прибавка массы тела составила 1,5±0,5 г (p>0,05). Рубцевание язв наступило у 6 (20%) животных, у остальных 24 (80%) средний размер площади язв уменьшился в 10 раз (0,06 см² против 0,6 см²) (p<0,05). Степень местного поражения уменьшилась в 2,7 раза (1,2±0,7 против 3,2±0,7) (p<0,05), а число лейшманий в очагах поражения – в 2,3 раза (1,5±0,5 против 3,5±0,4) (p<0,05).

На 60-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составил 5,0±1,1 г. Рубцевание язв наступило у всех хомяков, что соответствовало степени местного поражения, равной 0. Степень местного поражения уменьшилась в 32 раза (0,1±0,03 против 3,2±0,7) (p<0,05). Рубцевание язв наступило у всех золотистых хомяков при сохранении лишь

небольшой инфильтрации. Микроскопически в очагах поражения обнаружено в среднем $0,6 \pm 0,6$ лейшманий в мазке. Выше отмечено, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

Учитывая, что животные, пролеченные меглумина антимономатом, являются группой контроля, то при сравнении с опытными группами нами использованы показатели: степень местного поражения через 30 дней ($1,2 \pm 0,7$) и через 60 дней ($0,1 \pm 0,03$).

3.3.3. Результаты оценки эффективности лечения доксициклином экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков

Для изучения эффективности монотерапии доксициклином на модели ЗКЛ использованы 30 золотистых хомяков. Препарат вводили 1 раз в неделю в дозе $0,00033$ г на 100 г массы лабораторной модели. Максимально число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышало №4-5. Средняя масса золотистых хомяков в данной серии опытов составила $103,3 \pm 2,3$ г.

При лечении доксициклином экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление животных происходило в течение месяца, в среднем за $20,1 \pm 2,3$ дня, что достоверно в 2 раза быстрее, чем в контрольной группе (меглумина антимономат $40,7 \pm 3,2$ дня) ($p < 0,05$). С самого начала животные переносили лечение без каких-либо побочных реакций. Результаты оценки эффективности монотерапии доксициклином у золотистых хомяков ($N=30$) представлены в таблице 12.

Таблица 11 – Результаты оценки эффективности монотерапии доксициклином ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30)

Дни наблюдения	Масса лабораторной модели (г)	Средний размер язв (см ²)	Степень местного поражения (0/+)	Микроскопия/число лейшманий (0/+)*
До начала лечения	103,3±2,3	0,44	3,1±0,8	3,7±0,3
30-ый день после начала терапии	109,1±1,6	0	1,07±0,7	1,27±0,45
60-ый день после начала терапии	113,3±1,4	0	0,07±0,01	0,03±0,01
Срок клинического выздоровления (дни)	20,1±2,3			

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

На 30-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела хомяков составила 5,8±3,2 г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 3 недель, средний размер язвы равнялся 0 см. Степень местного поражения составляла 1,07±0,7 и кожные проявления были представлены лишь небольшой инфильтрацией на месте язвы. Сравнение степени местного поражения в данной опытной группе с контролем отличалось всего на 0,13, но животных с сохранившимися язвами не было. Иными словами, происходило активное рубцевание язв. Результаты микроскопического исследования соответствовали 1,27±0,45 лейшманий в мазке из очага поражения. Это в 2,9 меньше, чем до начала терапии (3,7±0,3) ($p<0,05$) и на 0,23 меньше, чем при лечении меглумина антимономатом (1,5±0,5) ($p>0,05$).

Существенно, что на 60-ый день эксперимента по сравнению с его началом, животные прибавили в весе, в среднем на 10,0±3,0 г. Степень местного поражения была минимальной – 0,07±0,01 (контроль 0,1±0,03). Результаты микроскопического исследования соответствовали 0,03±0,01 лейшманий в мазке из очага поражения, что в 20 раз меньше, чем в контроле (0,6±0,6) ($p<0,05$).

Подводя итог данному исследованию, можно заключить, что по всем критериям доксициклин более эффективен, чем меглумина антимононат, являющийся «золотым стандартом» при лечении лейшманиоза. Разрешение язвенного процесса на коже наступило в 2 раза быстрее ($40,7 \pm 3,2$ против $20,1 \pm 2,3$) ($p < 0,05$), при показателях степени местного поражения ($0,1 \pm 0,03$ и $0,07 \pm 0,001$) ($p < 0,05$) и результатах микроскопического исследования лейшманий в мазке из очага поражения ($0,6 \pm 0,6$ и $0,03 \pm 0,01$) ($p < 0,05$).

3.3.4. Результаты оценки эффективности лечения цефтриаксоном экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков

Для изучения эффективности монотерапии цефтриаксоном на модели ЗКЛ использованы 30 золотистых хомяков. Препарат вводили 1 раз в неделю в дозе $0,00343$ г на 100 г массы лабораторной модели. Максимально число инъекций, учитывая гибель животных, не превышала №3. Средняя масса лабораторной модели в данной серии опытов составила $106,6 \pm 1,44$ г. Средний размер язв до начала терапии составлял $0,47$ см². Результаты оценки эффективности монотерапии цефтриаксоном ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30) представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты оценки эффективности монотерапии цефтриаксоном ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30)

Дни наблюдения	Масса лабораторной модели (г)	Средний размер язв (см ²)	Степень местного поражения (0/+)	Микроскопия (0/+)*
До начала лечения	$106,6 \pm 1,4$	0,47	$3,3 \pm 0,8$	$3,6 \pm 0,4$
30-ый день после начала терапии	$58,5 \pm 3,1$	1,05	$2,83 \pm 0,75$	$2,77 \pm 0,73$
60-ый день после начала терапии	_____	_____	_____	_____
Срок клинического выздоровления (дни)	Все животные погибли			

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

При лечении цефтриаксоном экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков наблюдалось резкое снижение массы, сопровождаемое снижением активности животных, апатией, потерей аппетита, жидким стулом, воспалительными изменениями конъюнктивы, скорее всего бактериальной этиологии. За 30 дней масса тела животных уменьшилась в 1,8 раза ($58,5 \pm 3,1$ против $106,6 \pm 1,4$ г) ($p < 0,05$). Средний размер язвы, наоборот, увеличился в 2,2 раза ($1,05$ против $0,47$) ($p < 0,05$). Степень местного поражения достоверно не изменилась и составила $2,83 \pm 0,75$ ($p > 0,05$). Результаты микроскопического исследования лейшманий в мазке из очага поражения ($2,77 \pm 0,73$) несколько снизились ($p < 0,05$), что возможно обусловлено специфическим действием препарата.

Все животные погибли к концу первого – началу второго месяца.

Подводя итог данному исследованию, можно заключить, что при использовании терапевтической дозы цефтриаксона для лечения золотистых хомяков, экспериментально зараженных промастиготами лейшманий, наступает гибель животных. Это согласуется с полученными ранее данными и высокой токсичности препарата. С другой стороны, доказанный факт эффективности цефтриаксона в эксперименте *in vitro* исключает его возможно применения по данным *in vivo* и результатам токсикологического исследования.

3.3.5. Результаты оценки эффективности лечения цефотаксимом (клафораном) экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков

Для изучения эффективности монотерапии цефотаксимом на модели ЗКЛ использованы 30 золотистых хомяков. Препарат вводили 1 раз в неделю в терапевтической дозе $0,012$ г на 100 г массы лабораторной модели. Максимально число инъекций, учитывая гибель животных, не превышало №3. Средняя масса лабораторной модели до начала терапии в данной серии опытов была $116,1 \pm 2,5$ г. Средний размер язв до начала терапии составлял $0,42 \text{ см}^2$.

Результаты оценки эффективности монотерапии цефотаксимом ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30) представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты оценки эффективности монотерапии цефотаксимом ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30)

Дни наблюдения	Масса лабораторной модели (г)	Средний размер язв (см ²)	Степень местного поражения (0/+)	Микроскопия (0/+)*
До начала лечения	116,1±2,5	0,42	3,2±0,6	3,7±0,4
30-ый день после начала терапии	75,1±4,4	1,03	3,07±0,7	3,13±0,7
60-ый день после начала терапии	_____	_____	_____	_____
Срок клинического выздоровления (дни)	Все животные погибли			

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

При лечении цефотаксимом экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков зарегистрирована абсолютная смертность животных к концу четвертой – началу пятой недели. У животных наблюдалось нарастание кахексии, сопровождаемое снижением активности животных, апатией, потерей аппетита, жидким стулом, более выраженными острыми воспалительными изменениями конъюнктивы, чем при использовании цефтриаксона. За 30 дней масса тела животных уменьшилась в 1,6 раза (75,1±4,39 против 116,1±2,5 г) ($p<0,05$). Средний размер язвы, наоборот, увеличился в 2,5 раза (1,03 см² против 0,42 см²) ($p<0,05$). Степень местного поражения достоверно не изменилась и составила 3,07±0,7 ($p>0,05$). Результаты микроскопического исследования лейшманий в мазке из очага поражения свидетельствуют о небольшом снижении значения данного показателя (3,13±0,7) ($p>0,05$).

Подводя итог данному исследованию, можно заключить, что при использовании терапевтической дозы цефотаксима для лечения золотистых хомяков, экспериментально зараженных промастиготами лейшманий, наступает гибель животных. Это согласуется с полученными ранее данными о

высокой токсичности препарата и его недостаточной эффективности в эксперименте *in vitro*.

3.3.6. Результаты оценки эффективности лечения интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (реаферон) экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков

Для изучения эффективности монотерапии интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным на модели ЗКЛ использованы 30 золотистых хомяков. Препарат вводили 1 раз в неделю в дозе 164.410 МЕ на 100 г массы лабораторной модели. Максимально число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышало №4-5. Средняя масса лабораторной модели до начала терапии в данной серии опытов составила $109,5 \pm 1,9$ г. Средний размер язв до начала терапии составлял $0,49 \text{ см}^2$. Результаты оценки эффективности монотерапии интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30) представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты оценки эффективности монотерапии интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным ЗКЛ у золотистых хомяков (N=30)

Дни наблюдения	Масса лабораторной модели (г)	Средний размер язв (см^2)	Степень местного поражения (0/+)	Микроскопия (0/+)*
До начала лечения	$109,5 \pm 1,9$	0,49	$3,2 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,4$
30-ый день после начала терапии	$126,2 \pm 4,5$	0	$1,07 \pm 0,74$	$1,27 \pm 0,45$
60-ый день после начала терапии	$136,9 \pm 4,3$	0	$0,17 \pm 0,08$	$1,17 \pm 0,38$
Срок клинического выздоровления (дни)	$27,2 \pm 3,8$			

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

При лечении интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление животных происходило в течение месяца, в среднем за $27,2 \pm 3,8$. С самого начала лечения животные переносили его без каких-либо побочных реакций.

На 30-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составил $16,7 \pm 4,2$ г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 4 недель, средний размер язвы равнялся 0 см^2 . Степень местного поражения уменьшилась в 3 раза ($1,07 \pm 0,74$ против $3,2 \pm 0,6$) ($p < 0,05$) и кожные проявления были представлены лишь выраженной инфильтрацией на месте язвы. Результаты микроскопического исследования свидетельствовали о снижении инфицированности очага поражения в 2,9 раза ($1,27 \pm 0,45$ против $3,6 \pm 0,4$) ($p < 0,05$).

На 60-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составила 25%. Степень местного поражения уменьшилась в 18,8 раз ($0,17 \pm 0,08$ против $3,2 \pm 0,6$) ($p < 0,05$), а показатель инфицированности очага поражения лейшманиями – в 3,2 раза ($1,17 \pm 0,38$ против $3,7 \pm 0,4$).

Подводя итог данному исследованию, можно заключить, что сроки разрешения клинических проявлений на коже при использовании интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного были всего на неделю больше, чем при использовании доксициклина и на 2 недели меньше, чем меглумина антимоноата. Прибавка массы тела при использовании интерферона была максимальной (25%) по сравнению с доксициклином (9,7%) и меглумина антимоноатом (4,6%). Степени местного поражения на 30 день у доксициклина и интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного не отличалась ($1,07 \pm 0,7$) и были меньше, чем у меглумина антимоноата ($1,2 \pm 0,7$). Обращает на себя внимание факт различий в оценке микроскопического исследования по выявлению лейшманий в очагах поражения спустя 60 дней. Наилучший результат зарегистрирован у доксициклина ($0,03 \pm 0,01$), промежуточный – у меглумина антимоноата ($0,6 \pm 0,6$) и затем – у интерферона альфа-2b

человеческого рекомбинантного ($1,17 \pm 0,38$). Можно полагать, что интерферон, обладая опосредованным противовоспалительным и частично специфическим эффектом, способствует разрешению высыпаний на коже, но не обеспечивает полную элиминацию возбудителя.

Это послужило поводом для оценки эффективности двух вариантов комбинированной терапии, включающей меглумина антимононат в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным и доксициклин в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным.

3.3.7. Результаты оценки эффективности комбинированного лечения меглумина антимононатом (глюкантимом) + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (реаферон) экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков

Для изучения эффективности комбинированной терапии меглумина антимононатом + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный на модели ЗКЛ использованы 24 золотистых хомяков. Препарат вводили 1 раз в неделю в дозе $0,03 \text{ г} + 155 \text{ 356 ME}$ на 100 г массы лабораторной модели. Максимально число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышало №4-5. Средняя масса лабораторной модели в данной серии опытов составила $110,5 \pm 3,6 \text{ г}$. Средний размер язв до начала терапии составлял $0,47 \text{ см}^2$. Результаты оценки эффективности комбинированной терапии меглумина антимононатом + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный ЗКЛ у золотистых хомяков ($N=24$) представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты оценки эффективности комбинированной терапии меглумина антимономатом + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (реаферон) ЗКЛ у золотистых хомяков (N=24)

Дни наблюдения	Масса лабораторной модели (г)	Средний размер язв (см ²)	Степень местного поражения (0/+)	Микроскопия (0/+)*
До начала лечения	110,5±3,6	0,47	3,2±0,8	3,7±0,3
30-ый день после начала терапии	136,0±3,4	0	0,46±0,2	1,3±0,46
60-ый день после начала терапии	136,1±1,7	0	0	0,09±0,03
Срок клинического выздоровления (дни)	22,1±1,2			

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

При лечении меглумина антимономатом + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление животных происходило в течение месяца, в среднем за 22,1±1,2 дня. С самого начала животные переносили лечение без каких-либо побочных реакций.

На 30-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составил 25,5±4,9 г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 4 недель, средний размер язвы равнялся 0 см². Степень местного поражения уменьшилась в 7 раз (0,46±0,5 против 3,2±0,8) (p<0,05) и кожные проявления были представлены лишь инфильтрацией на месте язвы в 45,8% случаев. Результаты микроскопического исследования свидетельствовали о снижении инфицированности очага поражения в 2,9 раза (1,3±0,46 против 3,7±0,3) (p<0,05).

На 60-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составила 23,2% (25,6±3,8 г). Степень местного поражения равнялась 0 см², а показатель инфицированности очага поражения

лейшманиями улучшился на 97,6% или в 41,1 раза ($0,09 \pm 0,03$ против $3,7 \pm 0,3$) ($p < 0,05$).

Подводя итог данному исследованию, можно заключить, что сроки разрешения клинических проявлений на коже при использовании комбинированной терапии меглумина антимономатом в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным были на 3 недели или в 1,8 раза меньше, чем при использовании монотерапии меглумина антимономатом ($22,1 \pm 1,2$ дня против $40,7 \pm 3,2$) ($p < 0,05$). Прибавка массы тела животных на 30 день эксперимента при комбинированной терапии была в 16,5 раз больше, чем при монотерапии (23,1% против 1,4%) ($p < 0,05$), степень местного поражения – в 2,6 раза меньше ($0,46 \pm 0,5$ против $1,2 \pm 0,7$), а результаты микроскопического исследования лейшманий в мазках из очага поражения – практически идентичными ($1,3 \pm 0,46$ и $1,5 \pm 0,5$, соответственно).

На 60 день при полном рубцевании язв у животных при комбинированной терапии в сравнении с монотерапией показатель инфицированности очага поражения лейшманиями был в 6,7 раза меньше ($0,09 \pm 0,03$ против $0,6 \pm 0,6$) ($p < 0,05$).

3.3.8. Результаты эффективности комбинированного лечения доксидиклином + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (реаферон) экспериментального ЗКЛ у золотистых хомуков

Для изучения эффективности комбинированной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным на модели ЗКЛ проведено 2 серии опытов с интервалом 2 месяца. В каждой серии опытов задействовано по 12 золотистых хомуков. Препараты вводили 1 раз в неделю одновременно разными шприцами внутримышечно в симметричные участки тела (бедро). Доза доксициклина составляла 0,0003 г на 100 г массы лабораторной модели, а доза интерферона альфа-2b человеческого

рекомбинантного – 156146 МЕ. Максимально число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышала №3-4. Средняя масса лабораторной модели до начала терапии в данной серии опытов составила $103,3 \pm 1,1$ г, Средний размер язв до начала терапии составлял $0,46 \text{ см}^2$. Результаты оценки эффективности комбинированной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным ЗКЛ у золотистых хомяков (N=24) представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты оценки эффективности комбинированной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным ЗКЛ у золотистых хомяков (N=24)

Дни наблюдения	Масса лабораторной модели (г)	Средний размер язв (см^2)	Степень местного поражения (0/+)	Микроскопия/ число лейшманий (0/+)
До начала лечения	$103,3 \pm 1,1$	0,46	$3,1 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,4$
30-ый день после начала терапии	$134,8 \pm 1,3$	0	$0,042 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,3$
60-ый день после начала терапии	$135,1 \pm 1,3$	0	0	$0,04 \pm 0,01^*$
Срок клинического выздоровления (дни)	$19,2 \pm 0,9$			

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

При комбинированной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление животных происходило в течение месяца, в среднем за $19,2 \pm 0,9$ дня. С самого начала животные переносили лечение без каких-либо побочных реакций.

На 30-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составил $31,5 \pm 1,3$ г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 3 недель, средний размер язвы равнялся 0 см^2 . Степень местного

поражения уменьшилась в 74 раза ($3,1 \pm 0,7$ против $0,042 \pm 0,02$) ($p < 0,05$) и кожные проявления были представлены лишь небольшой инфильтрацией на месте язвы (у одного животного), т.е. происходило их активное рубцевание. Результаты микроскопического исследования свидетельствовали о снижении инфицированности очага поражения в 4 раза ($3,6 \pm 0,4$ против $0,9 \pm 0,3$) ($p < 0,05$).

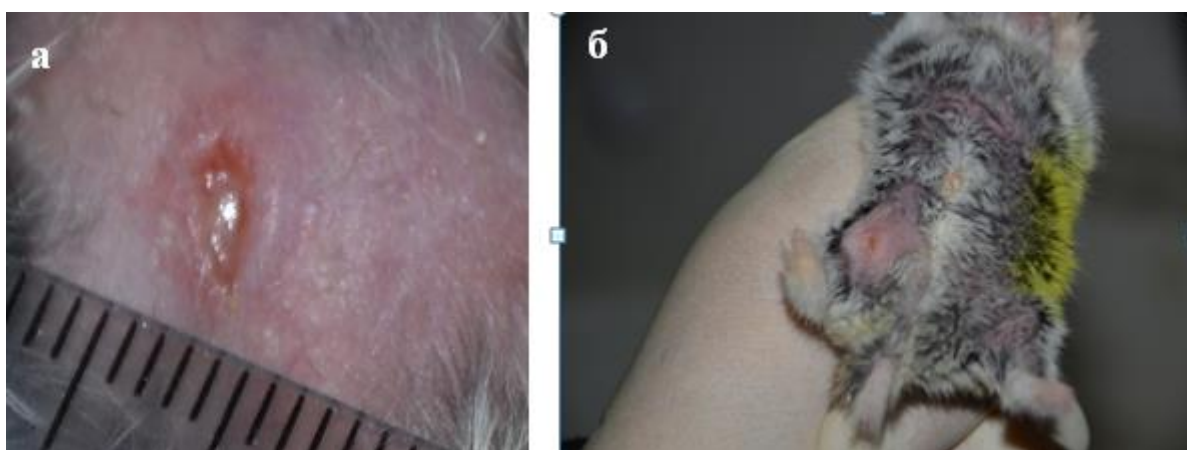


Рисунок 12 – Эффективность лечения ЗКС у золотистых хомяков доксициклином в сочетании интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным: а – язва на месте введения доксициклина в область паха (размер 0,5 x 0,2 см); б – очаг поражения через 2,5 недели после начала терапии, кровянистая корочка (0,1 см в диаметре) на фоне рубцовой ткани с инфильтратом

На 60-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составила 30,8% ($31,8 \pm 1,9$ г). Степень местного поражения равнялась 0, а показатель инфицированности очага поражения лейшманиями улучшился на 98,9% ($3,6 \pm 0,4$ против $0,04 \pm 0,01$).

Подводя итог данному исследованию, можно заключить, что сроки разрешения клинических проявлений на коже при использовании комбинированной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным были идентичными ($19,2 \pm 0,9$ дня и $20,1 \pm 2,3$) ($p > 0,05$). Прибавка массы тела животных на 30 день эксперимента при комбинированной терапии была в 5,5 раза больше, чем при монотерапии (30,8%

против 5,6%) ($p < 0,05$), степень местного поражения – в 25,5 раз меньше ($0,042 \pm 0,02$ против $1,07 \pm 0,7$) ($p < 0,05$), а результаты микроскопического исследования лейшманий в мазках из очага поражения – в 1,4 раза лучше ($0,9 \pm 0,3$ против $1,27 \pm 0,45$, соответственно).

На 60 день при полном рубцевании язв у животных при комбинированной терапии и монотерапии в мазках лейшманий отсутствовали.

3.4. Сравнительный анализ эффективности препаратов и методов лечения экспериментального зкл у золотистых хомяков

Сравнительный анализ эффективности лечения экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков с использованием монотерапии (меглумина антимономатом, доксициклином, интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным) и комбинированной терапии (меглумина антимономат + интерфероном альфа-2b человеческий рекомбинантный и доксициклин + интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным) на 30-ый день после начала терапии проведен по следующим критериям:

- средняя прибавка массы тела золотистых хомяков,
- сроки клинического выздоровления,
- средняя степень местного поражения на коже,
- среднее число лейшманий, выявленных микроскопически в очагах поражения.

Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Показатели эффективности противолейшманиальных препаратов в эксперименте *in vivo* на ЗХ: МА, ДЦ, ИФ и их комбинаций МА + ИФ, ДЦ + ИФ

Показатели	МА	ДЦ	ИФ	МА + ИФ	ДЦ + ИФ
Показатели до начала терапии					
Масса лабораторной модели (г)	107,8±1,7	103,3±2,3	109,5±1,9	110,5±3,6	103,3±1,1
Средний размер язв (см ²)	0,6	0,44	0,49	0,47	0,46
Степень местного поражения (0/+)	3,2±0,7	3,1±0,8	3,2±0,6	3,2±0,8	3,1±0,7
Микроскопия/число лейшманий (0/+)	3,5±0,4	3,7±0,3	3,6±0,4	3,7±0,3	3,6±0,4
Показатели через 30 дней после начала терапии					
Масса лабораторной модели (г)	109,3±1,6	109,1±1,6	126,2±4,5	136,0±3,4	134,8±1,3
Средний размер язв (см ²)	0,06	0	0	0	0
Степень местного поражения (0/+)	1,2±0,7	1,07±0,70	1,07±0,74	0,46±0,5	0,042±0,02
Микроскопия/число лейшманий (0/+)	1,5±0,5	1,27±0,45	1,27±0,45	1,3±0,46	0,9±0,3
Показатели через 60 дней после начала терапии					
Масса лабораторной модели (г)	112,8±1,6	113,3±1,4	136,9±4,3	136,1±1,7	135,1±1,3
Средний размер язв (см ²)	0	0	0	0	0
Степень местного поражения (0/+)	0,1±0,03	0,07±0,01	0,17±0,08	0	0
Микроскопия/число лейшманий (0/+)	0,6±0,6	0,03±0,01	1,17±0,38	0,09±0,03	0,04±0,01
Средний срок клинического выздоровления (дни)	40,7±3,2	20,1±2,3	27,2±3,8	22,1±1,2	19,2±0,9

*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

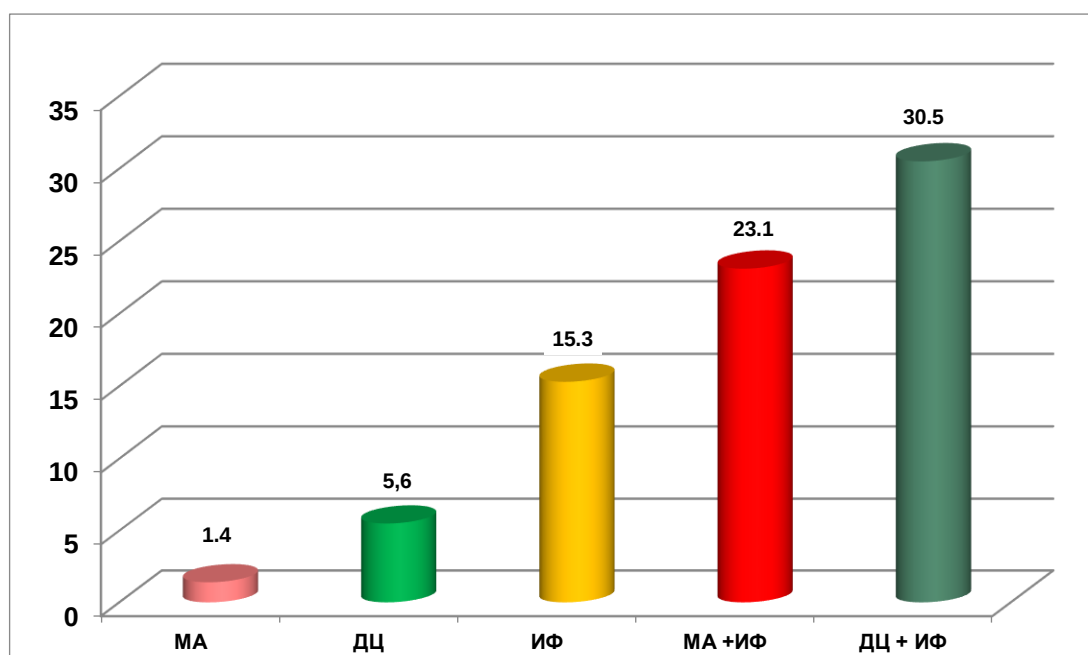


Рисунок 13 – Средняя прибавка массы тела золотистых хомяков на 30-ый день эксперимента *in vivo* (%)

Средняя прибавка массы тела золотистых хомяков при использовании вышеперечисленных препаратов и методов лечения была минимальной при монотерапии меглума антимономатом (1,4%) и максимальной – при комплексной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (30,5%). Прибавка массы тела золотистых хомяков была при монотерапии доксициклином 4 раза выше, чем при монотерапии МА. Комбинированная терапия увеличивала прибавку массы тела как при использовании МА, так и доксициклина. При комбинированной терапии МА + ИФ показатель прибавки массы тела был в 16,5 раза выше, чем при монотерапии МА. А при комбинированной терапии доксициклином + ИФ – в 5,5 раза выше, чем при монотерапии доксициклином. Это свидетельствует о меньшей токсичности последнего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность проблемы ЗКЛ для практикующих врачей РФ явилась предпосылкой для изучения новых походов в выборе методов лечения заболевания. Постоянная миграция населения РФ в эндемичные по лейшманиозу регионы (туристические поездки, служебные командировки, работа по контракту и др.) способствует заносу инфекции в страну. Кроме того, прибытие в Россию инфицированных людей из стран Ближнего Востока, Азии, Африки и Латинской Америки, стран СНГ, где ЗКЛ регистрируют достаточно часто, увеличивает число обращений данного контингента в лечебные учреждения для оказания медицинской помощи. Выявление завозных случаев как кожного [70; 67; 8; 66; 72; 69; 71; 68; 64] и висцерального лейшманиоза [62; 82; 79; 63; 80] зарегистрировано врачами в различных регионах нашей страны.

Поэтому у врачей практического здравоохранения возникают серьезные проблемы как в плане диагностики, так и выбора метода лечения. Учитывая, что ЗКЛ спорадически завозят в Россию из стран Северной Африки (Египет, Тунис), Ближнего Востока (Турция, Израиль, Иордания), СНГ (Азербайджан, Армения, Узбекистан, Таджикистан), Грузии, где основным возбудителем является *Leishmania major* (*L. major*), мы выбрали данный инфекционный агент для доклинических исследований из криобанка Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. По журналу отбирали наиболее вирулентные штаммы *L. major*.

В качестве лабораторной модели использовали золотистых хомяков – Golden Syrian hamster (GSH), т.к. они являются классической моделью висцерального лейшманиоза и восприимчивы к заболеванию. Их выбор был обусловлен и тем, что нами использована лабораторная культура *L. major*, хранившаяся долгое время в криобанке института. Животные закупались в питомнике лабораторных животных «Пущино», имели ветеринарный паспорт, содержание и питание соответствовали нормативным документам.

Анализ литературы позволил нам установить, что стандарты лечения ЗКЛ в нашей стране отсутствуют. В национальном руководстве по дерматовенерологии (2013) для его лечения предлагается использовать 12 препаратов, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств (ГРЛС) МЗ России. Хорошо зарекомендовавший себя антибиотик из группы аминогликозидов (мономицин) в настоящее время в России не производится. Препарат 5-валентной сурьмы (солюсурьмин), поставлявшийся из Туркмении, в ГЛРС РФ не зарегистрирован. В рекомендациях ВОЗ (2010), в Руководстве по ведению случаев и эпиднадзору за лейшманиозами в Европейском регионе ВОЗ (2018) и в методических рекомендациях «LeishMan» для лечения ЗКЛ предлагают меглумина антимонат (глюкантим), стибоглюконат натрия (пентастам), милтефозин (импавидо), липосомальный амфотерицин В (амбисом), паромомицин, аминохинол, пентамидин. Из перечисленных препаратов в ГРЛС имеется только амфотерицин В без указания, что он липосомальный, а в инструкции фирмы производителя нет показаний для лечения КЛ.

На основании публикации авторов, лечивших больных ЗКЛ антибиотиками различных фармакологических групп мы для настоящего исследования выбрали доксициклин [31], цефотаксим (клафоран – цефалоспорин 3 поколения) [37]. Учитывая, что цефотаксим – импортный препарат (Франция), для импортозамещения актуальным является изучение *in vitro* и *in vivo* отечественного антибиотика из той же группы –

цефтриаксона. Универсальным препаратом для лечения лейшманиозов являются препараты 5-валентной сурьмы. Поэтому меглумина антимоноат использован нами в качестве контроля при оценке эффективности других препаратов.

Учитывая новые данные зарубежных авторов о патогенезе лейшманиоза, свидетельствующие, что этиологическим фактором заболевания могут быть не лейшмании, а вирус, находящийся в них (LRV – лейшманиальный РНК-вирус), в нашем доклиническом исследовании сделан акцент на изучение эффективности комбинированной терапии. На первом этапе изучены специфическая активность *in vitro* и *in vivo* трех антибиотиков (доксидиклин, цефтриаксон и цефотаксим) в сравнении с меглумина антимоноатом, а затем эффективность моно и комбинированной терапии доксидиклином, глюкантимом и их сочетания с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным.

Такой подход к проведению НИР позволил *in vitro* провести сравнительную оценку трех антибиотиков (доксидиклина, цефотаксима, цефтриаксона) на промастиготы лейшманий с учетом их минимальных доз, количества протистов в поле зрения и показателя инактивации их подвижности. Доказано лидирование доксидиклина и цефтриаксона. Минимальные дозы обоих препаратов приводят к абсолютному подавлению подвижности возбудителя. Повышение терапевтической дозы препаратов не обосновано. Сравнение этих препаратов с меглумина антимоноатом показало их превосходство по всем показателям.

В эксперименте *in vivo* на золотистых хомяках доказано отсутствие токсического действия антибиотика доксидиклина и иммуномодулятора интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного и установлен выраженный токсический эффект препаратов из группы цефалоспоринов III поколения – цефотаксима и цефтриаксона.

Доказана *in vivo* высокая противолейшманиальная активность антибиотика тетрациклинового ряда (доксциклина) при экспериментальном ЗКЛ у золотистых хомяков. На примере цефтриаксона показано несоответствие результатов *in vitro* и *in vivo*. В первом случае его эффективность была высокой, во втором – животные погибали.

Установлен *in vivo* факт повышения эффективности доксциклина и меглумина антимоноата при комплексной терапии с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным. Использование интерферона в комплексной терапии свидетельствует о синергизме данных препаратов. Это патогенетически проявляется в более раннем заживлении язвенного дефекта и элиминации лейшманий из очага поражения при значительном увеличении массы тела у животных.

Золотистые хомяки, являющиеся «золотым стандартом» для воспроизведения экспериментальной модели ВЛ, с успехом могут быть использованы для воспроизведения экспериментальной модели ЗКЛ.

Оценка специфической активности доксциклина в эксперименте *in vitro* и *in vivo* обосновывает целесообразность расширения показаний для данного препарата, в частности, для использования при кожном лейшманиозе.

Комбинированная терапия, включающая доксциклина и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, а также меглумина антимоноат и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный обладает более выраженным терапевтическим эффектом. Такая тактика в дальнейшем (после клинических испытаний) может быть рекомендована для лечения зоонозного кожного лейшманиоза.

ВЫВОДЫ

1. Инкубационный период экспериментального ЗКЛ у хомяков колеблется от 1 до 8 мес., составляя в среднем $76,8 \pm 21,8$ дня. У 58,1% животных клинические проявления ЗКЛ возникают в течение 2 мес., у 41,9% – спустя 2 мес., в том числе у 30,8% – через 3 мес. Размер язв до 1 см в диаметре зарегистрирован в 61,3% случаев, до 1,5 см – в 38,7%. Лимфостаз в области половых органов (7,6%) наблюдается редко. При локализации язв на ушных раковинах наблюдается частичное или полное расплавление хрящевой ткани.

2. Сравнительная оценка воздействия *in vitro* трех антибиотиков (доксициклина, цефотаксима, цефтриаксона) на промастиготы лейшманий с учетом их минимальных доз, количества протистов в поле зрения и показателя инактивации их подвижности свидетельствует о лидировании доксициклина и цефтриаксона. Минимальные дозы обоих препаратов приводят к абсолютному подавлению подвижности возбудителя. Хотя специфическая активность доксициклина при количественном измерении числа промастигот в 2,6 раза ниже, чем у цефтриаксона (2,250 и 5,083, соответственно), но минимальная терапевтическая доза доксициклина в 15 раз меньше, чем у цефтриаксона (0,0006 г против 0,009 г, соответственно). Повышение терапевтической дозы препаратов не обосновано. Сравнение этих препаратов с меглумина антимоном (глюкантимом) показало их превосходство по всем показателям.

3. Доксициклин, меглумина антимоном (глюкантима) и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (реаферон) при экспериментальном изучении их токсичности *in vivo* на ЗХ не обладают таковой при увеличении

терапевтической дозы препарата в несколько раз. Выраженной токсичностью обладают оба препарата из группы цефалоспоринов III поколения – цефотаксим (клафоран) и цефтриаксон

4. *In vivo* цефтриаксон и цефотаксим (клафоран) в терапевтической дозе вызывают гибель лабораторных животных. Монотерапия меглумина антимономатом, доксициклином и интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (реафероном) достаточно эффективна и не различается к 30 дню их применения по таким показателям как средняя степень местного поражения ($1,20 \pm 0,70$; $1,07 \pm 0,70$ и $1,07 \pm 0,74$, соответственно) и среднему числу лейшманий в очаге поражения ($1,50 \pm 0,50$; $1,27 \pm 0,45$ и $1,27 \pm 0,45$, соответственно). Отличия зарегистрированы в показателях средней прибавки массы тела (максимальная при лечении интерфероном – 15,3%), средних сроках клинического выздоровления (минимальный при лечении доксициклином – $20,1 \pm 2,3$ дня). Лейшмании в очаге поражения на 60 день полностью отсутствовали при лечении доксициклином.

5. Комплексная терапия экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков по данным *in vivo* позволила повысить эффективность меглумина антимономата и доксициклина за счет интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного по всем показателем в сравнении с монотерапией.

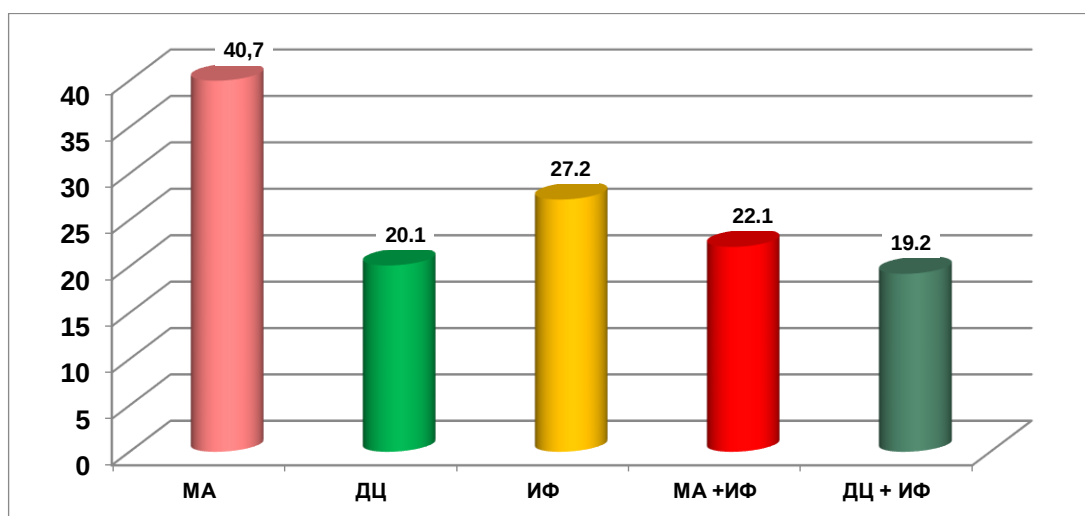


Рисунок 14 – Средние сроки клинического выздоровления золотистых хомяков в эксперименте *in vivo* (дни)

Сравнение средних сроков клинического выздоровления золотистых хомяков свидетельствует, что максимальный срок зарегистрирован при использовании монотерапии меглумина антимономатом ($40,7 \pm 3,2$ дня). При других видах терапии он был значительно меньше. При монотерапии ИФ эти сроки ($27,2 \pm 3,8$) были достоверно больше таковых при монотерапии доксициклином ($20,1 \pm 2,3$), и при обоих видах комбинированной терапии – МА + ИФ ($22,1 \pm 1,2$) и доксициклином + ИФ ($19,2 \pm 0,9$). Полученные данные с определенной долей вероятности свидетельствуют о синергизме специфического действия доксициклина, препарата 5-валентной сурьмы и интерферона. Уменьшение сроков клинического выздоровления при комбинированной терапии меглумина антимономатом в сочетании его с интерфероном по сравнению с монотерапией в 1,8 раза ($40,7 \pm 3,2$ против $22,1 \pm 1,2$) возможно обусловлено также снижением токсичности препарата 5-валентной сурьмы.

Сравнение средних степеней местного поражения на коже через 30 дней после начала терапии свидетельствовало, что только при лечении меглумина антимономатом рубцевание язв наступило только у 20% животных. При этом у остальных животных средний размер язв уменьшился в 10 раз.

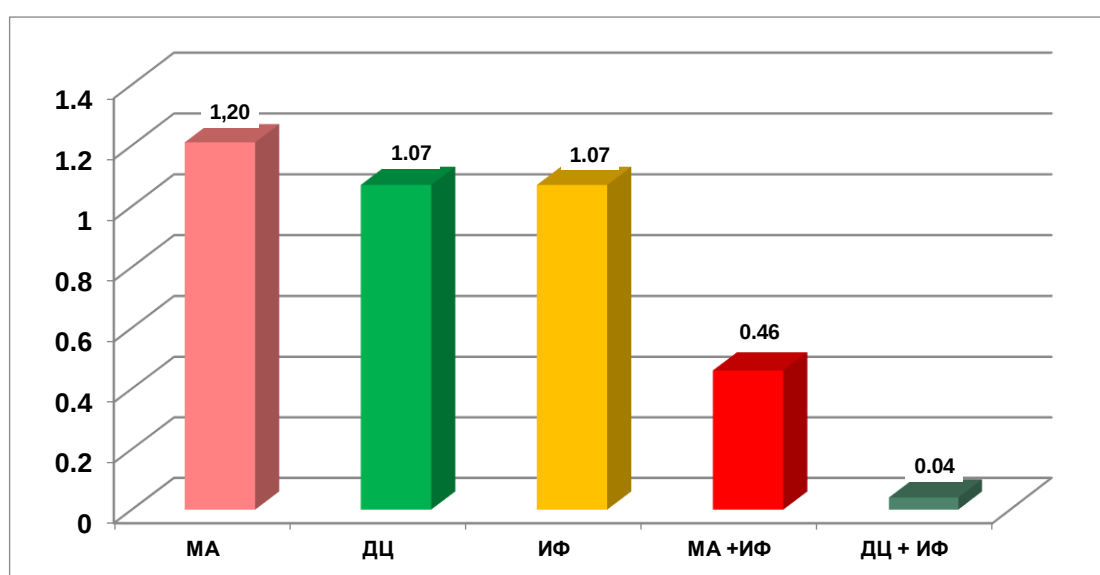


Рисунок 15 – Средняя степень местного поражения на коже золотистых хомяков через 30 дней в эксперименте *in vivo* (число +)

Средняя степень местного поражения на коже у золотистых хомяков наглядно свидетельствует о значительном преимуществе комбинированной терапии в обеих группах. При этом она была наименьшей при сочетании доксициклина с интерфероном ($0,04 \pm 0,02$). При использовании сочетанной терапии меглумина антимоноата с интерфероном этот показатель был в 10 раз больше ($0,46 \pm 0,5$ против $0,04 \pm 0,02$). При всех видах монотерапии этот показатель мало отличался.

Элиминация возбудителя из очага поражения при экспериментальном ЗКЛ через 30 дней после начала терапии (рисунок 16) наступала достоверно интенсивнее при использовании комбинированной терапии доксициклином в сочетании с интерфероном ($0,9 \pm 0,3$) ($p < 0,05$). При остальных видах терапии достоверные отличия отсутствовали.

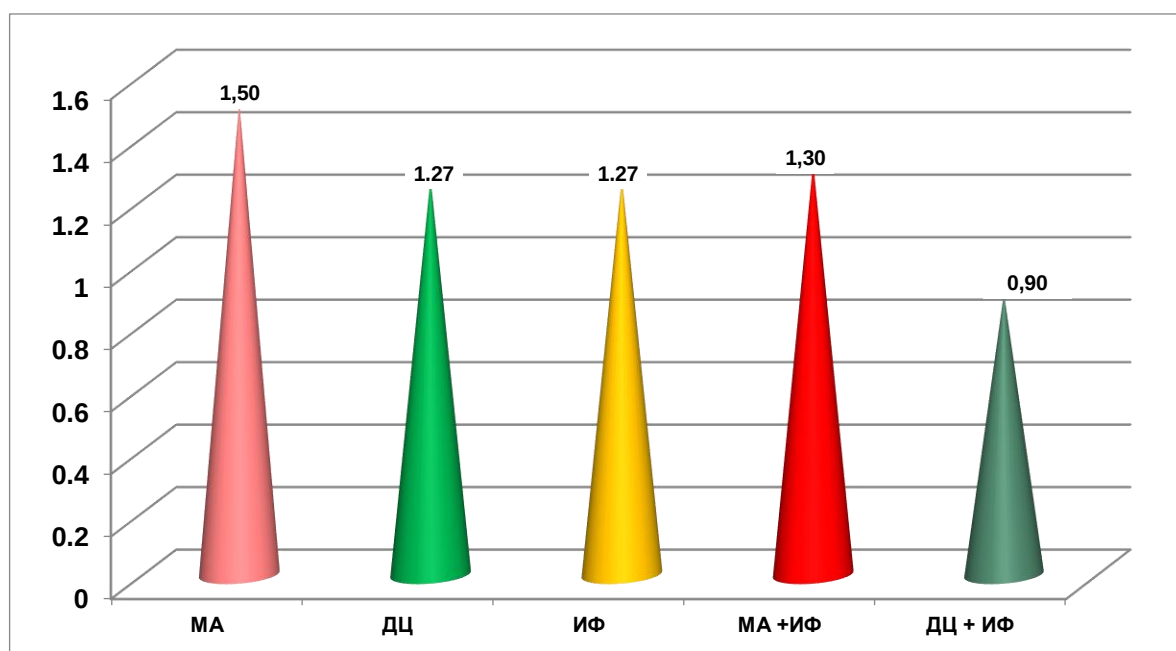


Рисунок 16 – Среднее число лейшманий, выявленных микроскопически у золотистых хомяков через 30 дней в эксперименте *in vivo* в очагах поражения (число +)

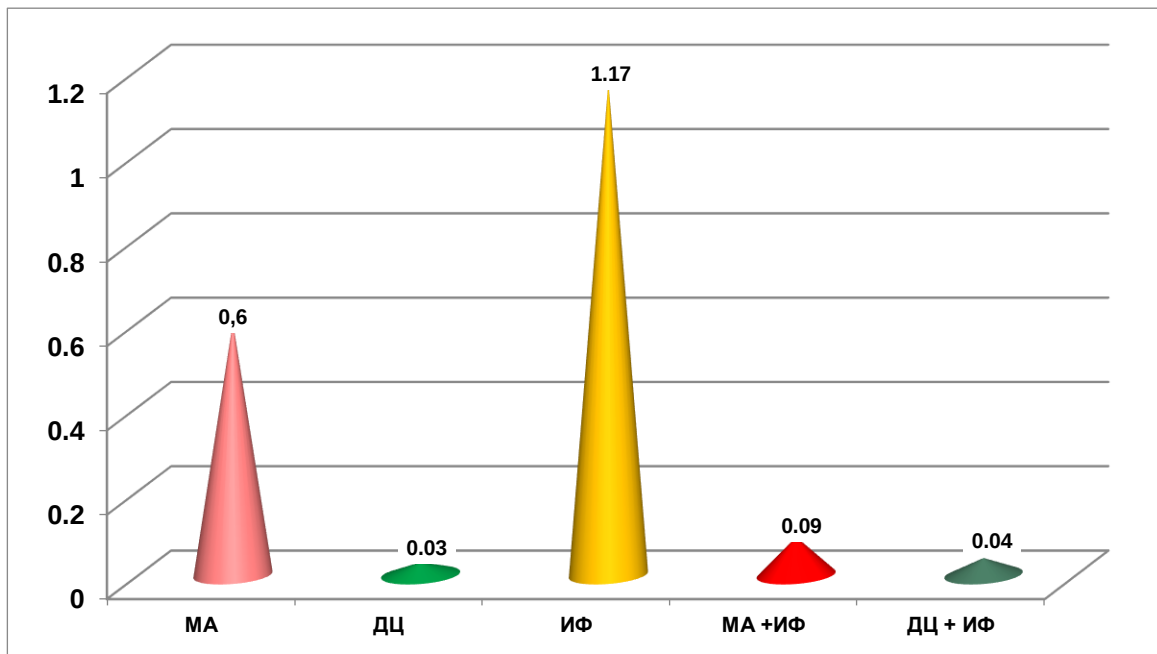


Рисунок 17 – Среднее число лейшманий, выявленных микроскопически у золотистых хомяков через 60 дней в эксперименте *in vivo* в очагах поражения (число +)

Существенно, что спустя 60 дней после начала терапии лейшмании в очагах поражения отсутствовали при использовании обоих методов комбинированной терапии ($0,09 \pm 0,03$ и $0,04 \pm 0,01$). При лечении интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным в виде монотерапии возбудитель в очагах поражения сохранялся в большем числе ($1,17 \pm 0,38$). Это является прямым доказательством о его незначительном специфическом действии.

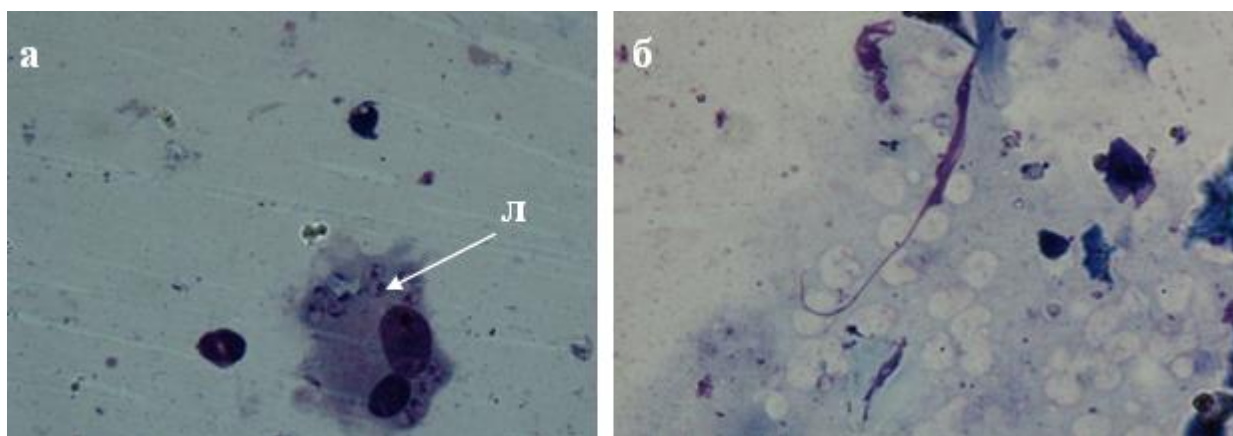


Рисунок 18 – Элиминация лейшманий из очага поражения при комбинированной терапии доксициклином в сочетании интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным: а – до лечения (14 в поле зрения), б – после завершения терапии, л – лейшмании

На фотографиях представлены результаты лечения экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков меглумина антимоном в сочетании интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (рисунок 19)

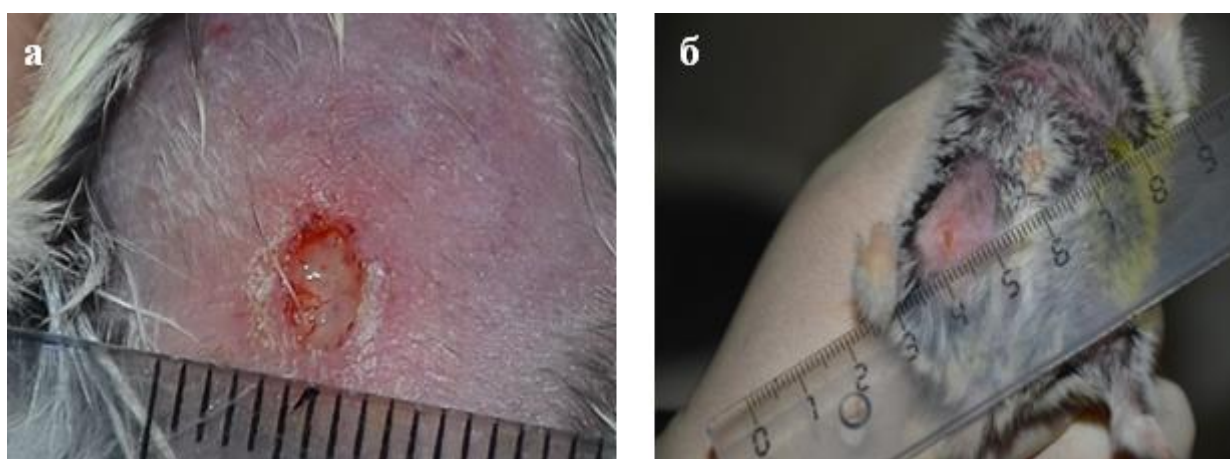


Рисунок 19 – Эффективность лечения ЗКС у золотистых хомяков меглумина антимоном в сочетании интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным: а – язва на месте введения доксициклина в область паха (размер 0,5 x 0,3 см); б – очаг поражения через 4,5 недели после начала терапии, рубец и инфильтрация

Общеизвестный факт, что ЗКЛ в природных условиях имеет способность к саморазрешению в течение 2 -8 и иногда более месяцев. В лабораторных условиях следует ожидать аналогичной ситуации в связи с абсолютной идентичностью течения зоонозного кожного лейшманиоза у человека. Однако не всегда представлялась возможность наблюдать самозаживление язв у животных, поскольку в лабораторных условиях их продолжительность жизни не всегда составляла год. Как правило, лабораторные животные погибали раньше, чем наступало самоизлечение. Однако в течение 60 дней, в течение которых проходил опыт *in vivo*, на фоне терапии язвы рубцевались, в то время как у животных в отсутствии лечения язвы продолжали сохраняться и из периферических валиков микроскопически определялись амастиготы протиста.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В Федеральных клинических рекомендациях «Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем» (2016) нет схем для лечения кожного лейшманиоза. Информация о лечении данного заболевания представлена в Национальном руководстве «Дерматовенерология» (2011). В то же время при анализе официальных инструкций к перечисленным там препаратам установлено отсутствие в них показаний для лечения кожного лейшманиоза. С другой стороны, препараты, рекомендованные ВОЗ (2010) для лечения лейшманиоза, в ГРЛС РФ отсутствуют. Оценка специфической активности доксициклина в эксперименте *in vitro* и *in vivo* обосновывает целесообразность расширения показаний для данного препарата, в частности, для использования при кожном лейшманиозе.

В официальных инструкциях препаратов, рекомендованных Национальным руководством для использования в РФ, отсутствуют показания для их применения при кожном лейшманиозе.

Исследования по изучению специфической антилейшманиальной активности доксициклина, повышении терапевтической эффективности данного препарата и меглумина антимоноата могут быть использованы для решения вопроса о расширении клинических показаний для их использования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЛ	Висцеральный лейшманиоз	ИФ	Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный
ДЦ	Доксициклин	КЛ	Кожный лейшманиоз
ЗКЛ	Зоонозный кожный лейшманиоз	МА	Меглумина антимоноат
ЗХ	Золотистые хомяки	LRV	Лейшманиальный РНК-вирус
PKDL	Пост-кала-азар кожный лейшманиоз	ГРЛС	Государственный реестр лекарственных средств

ЛИТЕРАТУРА

1. Макарьин, А. А. Клиника и лечение кожного лейшманиоза / А. А. Макарьин // Москва-Ташкент. – 1934. – С. 41.
2. Гейденрейх, Л. Л. Пендинская язва / Л. Л. Гейденрейх// СПб. – 1888.
3. Трозянц, Г. Н. Народно-знахарские средства в лечении кожного лейшманиоза / Г. Н. Трозянц и Б. М. Щупак // Советское здравоохранение Туркмении. – 1941. – №3. – С. 24.
4. Марциновский, Е. И. Этиология «восточной язвы» (boutton d'Orient) и краткие сведения об этой болезни: диссертация на степень доктора медицины / Марциновский Евгений Иванович. – М., 1909. – 24 с.
5. Гительзон, И. И. Кожный лейшманиоз (пендинская язва)/ И. И. Гительзон // Туркменгосиздат. – Ашхабад. – 1933. – С. 276
6. Кузнецова, Ю. К. Микст-инфекции кожи с тонким эпидермисом и деликатные топические комбинированные средства / Ю. К. Кузнецова и Н. С. Сирмайс // Международный научно-исследовательский журнал. – 2013. – № 9-3 (16). – С. 24-30.
7. Слоним, М. И. О лечении кожного лейшманиоза / М. И. Слоним // Туркменский медицинский журнал. – 1922. – №2. – С. 12
8. Морозова, Л. Ф. Завозной лейшманиоз: дифференциальная диагностика и лечение / Л.Ф. Морозова и Н. И. Тумольская // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2014. – № 1. – С.48.

9. Морозов, Е. Н. Молекулярная диагностика паразитарных болезней / Е. Н. Морозов и К. Ю. Кузнецова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2014. – № 1. – С. 37.
10. Добротворская, Н. В. Проблемы кожного лейшманиоза / Н. В. Добротворская // Сборник работ Первого межреспубликанского совещания по кожному лейшманиозу и москитной проблеме. – Ашхабад. – 1940. – С. 56.
11. Ходукин, Н.И. К истории изучения лейшманиозов в России./ Н. И. Ходукин // Очерки по истории паразитологии. – М. – 1953. – С. 33.
12. Келлина, О.И. Испытание химиотерапевтической активности некоторых препаратов при экспериментальном кожном лейшманиозе белых мышей / О. И. Келлина // Проблемы медицинской и профилактики инфекций. – М. – 1964. – С. 40.
13. Кожевников П. В. Учение о кожном лейшманиозе / П. В. Кожевников, Н. В. Добротворская, Н. И. Латышев // Медгиз. – 1947. – С. 201.
14. Многотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. Том IX / П. Г. Сергиев (редактор). – М.: Издательство «Медицина», 1968. – 59 с.
15. Ханафиева, И.В. Применение иммуностимуляторов в терапии зоонозного кожного лейшманиоза : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Ханафиева Ирина Владимировна – Ашхабат, 1996.
16. Choi, C. M. Leishmaniasis: recognition and management with a focus on the immunocompromised / C. M. Choi and E.A. Lerner //Am J Clin Dermatol. –2002. –3(2). P. 91-105.
17. Бронштейн, А. М. Наблюдения зоонозного кожного лейшманиоза у московских туристов, посетивших Тунис, и их успешной терапии кетоконазолом / А. М. Бронштейн, Н. А. Малышев, И. В. Давыдова, В.

- П. Сергиев и Н. Г. Кочергин // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – С. 54.
18. Кузнецова, Ю. К. Фолликулит и резистентность к антибактериальной терапии: как лечить? / Ю. К. Кузнецова, Ю. Ю. Файрузова, К. Ю. Кузнецова и Н. С. Сирмайс // Лечащий врач. – 2016. – № 5. – С. 60.
 19. Петерсен, О.В. О специальных больницах для сифилитиков и кожных больных / О.В. Петерсен // Русский врач. – 1913. – № 43. – С. 57-58.
 20. Официальный сайт Роспотребнадзор [Электронный ресурс]. – Письмо Роспотребнадзора от 04.03.2015 № 01/2160-15-27 "О ситуации по лейшманиозам в Российской Федерации". – rospotrebnadzor.ru. – Режим доступа: <http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/5d4/2015-leishmanioz.pdf>.
 21. Официальный сайт ФМС России [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://мвд.пф/мвд/documents>.
 22. Asilian, A. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran / A. Asilian, T. Jalayer, J. A. Whitworth, R. L. Ghasemi, M. Nilforoosh-zadeh and P. Olliaro // Am J Trop Med Hyg. – 1995. № 53. – P. 648–651.
 23. Begona, M.-M. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis / M.-M. Begona, L.-V. Rogelio // Drugs. – 2013. – № 73. – P. 1889–1920.
 24. Ben Salah, A. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment / A. Ben Salah, H. Zakraoui, A. Zaatour, A. Ftaiti, B. Zaafouri, A. Garraoui, P. L. Olliaro, K. Dellagi, R. Ben Ismail // Am J Trop Med Hyg. – 1995. – № 53. – P. 162–166.

25. Laniado-Laborín, R. Amphotericin B: side effects and toxicity / R. Laniado-Laborín, M. N. Cabrales-Vargas // *Rev Iberoam Micol.* – 2009. – № 26(4). – P. 223-227.
26. Llanos-Cuentas, A. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru / A. Llanos-Cuentas, G. Tulliano, R. Araujo-Castillo, C. Miranda-Verastegui // *Clin Infect Dis.* – 2008. – № 46(2). – P. 223-231.
27. Zakraoui, H. Spontaneous course of lesions of leishmania major cutaneous leishmaniasis in Tunisia / H. Zakraoui, A. Ben Salah, A. Ftaiti, H. Marrakchi, A. Zaatour, B. Zaafour, Z. Ahmadi, A. Garraoui, A. Ben Osman, K. Dellagi, et al. // *Ann Dermatol Venereol.* – 1995. – № 122. – P. 405–407.
28. Lewis, D. The Phlebotomid sandflies of Yemen Arab Republic / D. Lewis // *Tropenmed Parasitol.* – 1974. – № 25(2). – P. 132-135.
29. Понировский, Е.Н. Эпидемиологическая ситуация по лейшманиозам в Российской Федерации: первые достоверные случаи местной передачи / Е. Н. Понировский, М. В. Стрелкова, В. Д. Завойкин // *Медицинская паразитология.* – 2015. – №3. – С. 34-36.
30. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильев и др. – Москва. – 2012. – С 591-596.
31. Masmoudi, A. Doxycycline for the treatment of cutaneous leishmaniasis / A. Masmoudi, A. Dammak, H. Chaaben, N. Maalej, F. Akrou, H. Turki // *Dermatology Online Journal.* – 2008. – № 14(8). – P. 22.
32. Khairulin, F. Ia. Treatment of cutaneous leishmaniasis with methacycline and doxycycline (vibramycin) / F. Ia. Khairulin, M. E. Ereshov, Kh. Kh. Khuseinova, A. A. Rozyreva, T. A. Sukhanova // *Vestn Dermatol Venerol.* – 1989. – № 3. – P. 62-66.
33. McGwire, B. S. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment / B. S. McGwire, A. R. Satoskar // *Q J Med.* – 2014. – № 107. – P. 7–14.

34. William, H. M. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment / H. M. William, M. Khaldoun // *Am Fam Phys.* – 2004. – № 69. – P. 1455-1460.
35. Bonnetblanc, J. M. Doxycycline / J. M. Bonnetblanc // *Ann Dermatol Venereol.* – 2002. – № 129. – P. 874-882.
36. Humbert, P., Treffel, P., Chapuis, J. F., Buchet, S., Derancourt, C., Agache, P. The tetracyclines in dermatology / P. Humbert, P. Treffel, J. F. Chapuis, S. Buchet, C. Derancourt, P. Agache // *J Am Acad Dermatol.* – 1991. – № 25. – P.691-697.
37. Шуйкина, Э. Е. Возможность антибиотикотерапии при лейшманиозах / Э. Е. Шуйкина, И. В. Курбатова, М. И. Курдина, Г. А. Плахотная, Е. В. Дегальцева // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* – 2009. – № 3. – С. 45-47.
38. Antinori, S. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travelers / S. Antinori, E. Gianelli, S. Calattini, E. Longhi, M. Gramiccia, M. Corbellino // *Clin Microbiol Infect.* – 2005. – № 11. – P. 343–346.
39. Nestor, S. Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (Paromomycin and Gentamicin) for Cutaneous Leishmaniasis in Panama / S. Nestor, C. Zeuz, N. Javier // *American Journal Tropical Medicine and Hygiene.* – 2013. – № 89 (3). – P. 557-563.
40. Asilian, A. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran / A. Asilian, T. Jalayer, J. A. Whitworth, R.L. Ghasemi, M. Nilforoosh-zadeh, P. Oliaro // *Am J Trop Med Hyg.* – 1995. – № 53. – P. 648–651.
41. Ueno, N. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival / N. Ueno, M. E. Wilson // *Trends Parasitol.* – 2012. – № 28. – P. 335–344.

42. Chang, K. P. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macro-phages in vitro / K. P. Chang, D. M. Dwyer // *Science*. – 1976. – №193. – P. 678–680.
43. Oliveira-Neto, M. P. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis / M. P. Oliveira-Neto, M. Mattos, C. S. Souza, O. Fernandes, C. Pirmez // *Int J Dermatol*. –1998. – № 37. – P. 846–849.
44. Marovich, M.A. Leishmaniasis recidivans recurrence after 43 years: a clinical and immunologic report after successful treatment / M.A. Marovich, R. Lira, M. Shepard, G.H. Fuchs, R. Kruetzer, T. B. Nutman, et al. // *Clin Infect Dis*. – 2001. – № 33. – P. 1076–1079.
45. Goto, H. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis / H. Goto, J. A. Lauletta-Lindoso // *Infect Dis Clin North Am*. – 2012. – № 26. – P. 293–307.
46. David, C. V. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis / C. V. David, N. Craft // *Dermatol Ther*. – 2009. – № 22. – P. 491–502.
47. de Oliveira. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection / C. I. de Oliveira, C.I. Brodskyn // *Front Immunol*. – 2012. – № 3. – P. 145.
48. Calvopina, M. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge – a review / M. Calvopina, R.X. Armijos, Y. Hashiguchi // *Mem Inst Oswaldo Cruz*. – 2004. – № 99. – P. 663–672.
49. Viscerotropic leishmaniasis in persons returning from Operation Desert Storm : MMWR Morb Mortal Wkly Rep1990-1991. – Centers for Disease Control, 1992. – № 41. – P. 131–134.
50. ter Horst, R. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome / R. ter Horst, S. M. Collin, K. Ritmeijer, A. Bogale, R. N. Davidson // *Clin Infect Dis*. – 2008. – № 46. – P. 1702–1709.
51. Okwor, I. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection / I. Okwor, J. E. Uzonna // *Immunol Res*. – 2013. – № 56. – P.163–171.

52. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases – WHO Technical Report Series 949. – Geneva, Switzerland, 2010. – P. 1–186.
53. Zijlstra, E. E. Post-kala-azar dermal leishmaniasis / E. E. Zijlstra, A. M. Musa, E. A. Khalil, I. M. el-Hassan, A. M. el-Hassan // *Lancet Infect Dis.* – 2003. – № 3. – P. 87–98.
54. Antinori, S. Post-kala-azar dermal leishmaniasis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with acquired immune deficiency syndrome / S. Antinori, E. Longhi, G. Bestetti, R. Piolini, V. Acquaviva, A. Foschi, et al. // *Br J Dermatol.* – 2007. – № 157. – P. 1032–1036.
55. Eiras, D. P. Cutaneous leishmaniasis: current treatment practices in the USA for returning travelers / D. P. Eiras, L. A. Kirkman, H. W. Murray // *Curr Treat Options Infect Dis.* – 2015. – № 7. – P. 52–62.
56. Blum, J. LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers / J. Blum, P. Buffet, L. Visser, et al. // *J Travel Med.* – 2014. – № 21. – P. 116–129.
57. Hodiament, C. Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: a comprehensive guide / C. Hodiament, P. Kager, A. Bart, et al. // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2014. – № 8. – P. 2832.
58. Van der Auwera, G. Species typing in dermal leishmaniasis / G. Van der Auwera, J. Dujardin // *Clin Microbiol Rev.* – 2015. – № 28. – P. 265–294.
59. William, H. M. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment / H. M. William, M. Khaldoun // *Am Fam Phys.* – 2004. – № 69. – P. 455–1460.
60. Bonnetblanc, J.M. Doxycycline / J.M. Bonnetblanc // *Ann Dermatol Venereol.* – 2002. – № 129. – P. 874–882.
61. Humbert, P. The tetracyclines in dermatology / P. Humbert, P. Treffel, J. F. Chapuis, S. Buchet, C. Derancourt, P. Agache // *J Am Acad Dermatol.* – 1991. – № 25. – P. 691–697.

62. Александрова, О. К. Средиземноморско-среднеазиатский лейшманиоз у пациента 17 лет / О. К. Александрова, В. В. Лебедев, А. С. Лыжина, Н. Х. Тхакушинова, Л. В. Дубова // Детские инфекции. – 2008. – № 7 (3). – С. 68-71.
63. Баранец, М. С. Клинико-эпидемиологические особенности висцерального лейшманиоза в республике Крым / М. С. Баранец, Т. Н. Ермак, Е. Н. Понировский // Терапевтический архив. – 2017. – № 89(11). – С. 100-104.
64. Исаева, М. С. Современные аспекты кожного лейшманиоза / М. С. Исаева, Т. О. Саидова // Научно-медицинский журнал «Вестник Авиценны». – 2016г. – №1. – С. 116-123.
65. Тумольская, Н. И. Клинические маски паразитарных болезней / Н. И. Тумольская, Н. Ю. Голованова, М. В. Мазманыч, В. Д. Завойкин // Инфекционные болезни: новости мнения, обучение. – 2014. – №1. – С. 17-27.
66. Бодня, Е. И. Два случая кожного лейшманиоза в Харькове / Е. И. Бодня, В. А. Савоськина, Т. А. Велиева // Дерматология та венерология. – 2014. – №3. – С. 57-63.
67. Заславский, Д. В. Верификация лейшманиоза кожи / Д. В. Заславский, Е. М. Андриенко, И. Ю. Александрова, Е. Л. Матвеева, С. Е. Семенова, М. Е. Зуев, А. А. Гайдук // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – N 5. – С.91-95.
68. Тихоновская, И. В. Кожный лейшманиоз: этиология, клиника, диагностика, лечение / И. В. Тихоновская, В. П. Адаскевич, В. О. Мяделец // Кожные и венерические болезни. – 2016. – С. 69-77.
69. Добрев, Х. П. Дерматоскопическая находка и криотерапия / Х. П. Добрев, Д. Г. Ночева, Д. И. Вучев, Р. Д. Гранчарова // Folia Medica. – 2015. – № 57(1). – С. 65-68
70. Тищенко, Л.Д. О причинах развития резистентности при кожном лейшманиозе у детей в Йемене и новый метод их комплексного лечения

- с использованием полиоксидония и витаминов группы В / Л. Д. Тищенко, А. Х. Мушара, Р. Р. Атауллаханов, А. Л. Тищенко, Н. С. Сергеева, М. Ю. Кралин, Г. В. Малахов, Ф. С. Халаф, Рамваджон Пурнимасинг // Вестник РУДН, серия Медицина. – 2001. – №3. – С. 122-123.
71. Мицура, В. М. Случай успешного лечения распространенной формы зооозного кожного лейшманиоза / В. М. Мицура, Е. Л. Красавцев, И. А. Разуванова // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – №4 (50). – с.90-93.
 72. Рахматов, А. Б. Актуальные проблемы кожного лейшманиоза / А. Б. Рахматов, З. М. Абидова, Н. Б. Бойназаров, О. В. Извекова, У. Б. Нурматов, Х. Т. Исраилов // Украинский журнал дерматологии, венерологии и косметологии. – 2014. – №3(54). – С. 63-69.
 73. Скрипкин, Ю. К. Дерматовенерология. Национальное руководство / под ред. акад РАМН Ю. К. Скрипкина, проф. Ю. С. Бутова, проф. О. Л. Иванова // М.: ГОЭТАР-Медиа. – 2011. – С.1024.
 74. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Деловой экспресс, 2016. – 768 с.
 75. Tarr, P. I. LR1: a candidate RNA virus of Leishmania / P. I. Tarr , R. F. Jr Aline , B. L. Smiley , J. Scholler , J. Keithly , K. Stuart // Proc Natl Acad Sci USA. –1988. – v.85(24). – P. 9572-9575.
 76. Kariyawasam, R. Influence of leishmania RNA virus 1 on proinflammatory biomarker expression in a human macrophage model of american tegumentary leishmaniasis / R. Kariyawasam, J. Grewal , R. Lau, A. Purssell, B. M Valencia, A. Llanos-Cuentas, A. K. Boggild // J Infect Dis. – 2017. – № 216(7). – P. 877-886.
 77. Hajjaran, H. Detection and molecular identification of leishmania RNA virus (LRV) in Iranian Leishmania species / H. Hajjaran, M. Mahdi, M.

- Mohebbali, K. Samimi-Rad, A. Ataei-Pirkooch, E. Kazemi-Rad, S. R. Naddaf, Raoofian R // *Arch Virol.* – 2016. – № 161(12). – P. 3385–3390.
78. Ives, A. MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden / A. Ives, S. Masina, P. Castiglioni, F. Prével, M. Revaz-Breton, M. A. Hartley, P. Launois, N. Fasel, C. Ronet // *PLoS One.* – 2014. – № 9(5). – 96766.
 79. Богадельников, И. В. Висцеральный лейшманиоз. Клинический случай / И. В. Богадельников, Н. В. Лагунова, Л. В. Лукьянец, А. Н. Сюрица, Е. А. Крюгер // *Здоровье ребенка.* – 2014. – №3 (54). – С.159-162.
 80. Джалилов, В.Ч. Эпидемиологическая ситуация по висцеральному лейшманиозу на территории Азербайджанской Республики в современный период / В.Ч. Джалилов // *Семейная медицина.* – 2017. – №5 (73). – С.107-109.
 81. Hartley, M.-A. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis / M.-A. Hartley, S. Drexler, C. Ronet, S. M. Beverley, N. Fasel // *Trends Parasitol.* – 2014. – № 30(8). – P. 412–422.
 82. Лазарев, В. В. Случай висцерального лейшманиоза у ребенка, проживающего в северной Осетии / В. В. Лазарев, Б. З. Албегова, Е. В. Гамиева, И. Г. Гуссоева // *Медицинский вестник Юга России.* – 2010. – №2. – С.77-79.
 83. Sosa, N. Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (paromomycin and gentamicin) for cutaneous leishmaniasis in Panama / N. Sosa, Z. Capitán, J. Nieto, M. Nieto, J. Calzada, H. Paz, C. Spadafora, M. Kreishman-Deitrick, K. Kopydlowski, D. Ullman, W.F. McCarthy, J. Ransom, J. Berman, C. Scott, M. Grogl // *Am J Trop Med Hyg.* – 2013. – № 89 (3). – P. 557-563.

84. Gholamian-Shahabad, M. R. Sandflies species composition, activity, and natural infection with *Leishmania*, parasite identity in lesion isolates of cutaneous leishmaniasis, central Iran / M.R. Gholamian-Shahabad, K. Azizi, Q. Asgari, M. Kalantari, M. D. Moemenbellah-Fard // *J Parasit Dis.* – 2018. – №42(2). – P. 209-215.
85. Lynn, M. A. *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases. M. A. Lynn, W. R. McMaster // *Trends Parasitol.* – 2008. – № 24. – P.103–105.
86. Depledge, D.P. Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds / D. P. Depledge, K. J. Evans, A. C. Ivens, N. Aziz, A. Maroof , P. M. Kaye, D. F. Smith // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2009. – № 3. – P. 476.
87. Smith, D. F. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis / D. F. Smith, C. S. Peacock , A. K. Cruz // *Int. J. Parasitol.* – 2007. – № 37. – P. 1173–1186.
88. Mukhopadhyay, D. Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery / D. Mukhopadhyay, J. E. Dalton, P. M. Kaye, M. Chatterjee // *Trends Parasitol.* – 2014. – № 30. – P. 65–74.
89. Kumar, D. Post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) developing after treatment of visceral leishmaniasis with amphotericin B and miltefosine / D. Kumar, V. Ramesh, S. Verma, M. Ramam, P. Salotra // *Ann. Trop. Med. Parasitol.* – 2009. – №103. – P. 727–730.
90. Khalil, E. A. Post-kala-azar dermal Leishmaniasis: a paradigm of paradoxical immune reconstitution syndrome in non-HIV/AIDS patients / E. A. Khalil, S. A. Khidir, A. M. Musa, B. Y. Musa, M. E. Elfaki, A. M. Elkadaru, E. Zijlstra, A. M. El-Hassan // *J. Trop. Med.* – 2013. – 275253.
91. Zijlstra, E. E. Post-kala-azar dermal leishmaniasis / E. E. Zijlstra, A. M. Musa, E. A. Khalil, I. M. el-Hassan, A. M. el-Hassan // *Lancet Infect. Dis.* – 2003. – № 3. – P. 87–98.
92. Ansari, N. A. Interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and IFN- γ receptor 1 are the major immunological determinants associated

- with post-kala azar dermal leishmaniasis / N. A. Ansari, V. Ramesh, P. Salotra // *J. Infect. Dis.* – 2006. – № 194. – P. 958–965.
93. Руководство по ведению случаев и эпиднадзору за лейшманиозами в Европейском регионе ВОЗ / Gradoni L., López-Vélez R., Mokni M. – UN City: Всемирная организация здравоохранения Европейское региональное бюро–2018.
 94. Blum, G. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers / J. Blum, P. Desjeux, E. Schwartz, B. Beck, C. Hatz // *J Antimicrob Chemother.* – 2004. – Vol.53. – p. 158-166.
 95. Hengg, U.R. Cutaneous leishmaniasis / U. R. Hengg, A. Marini // *Hautarzt.* – 2008. – Vol.59. – p. 627-332.
 96. Руководство по эпидемиологии, клинике, лабораторной диагностике, лечению и профилактике лейшманиозов в Республике Таджикистан / Каримов С. С. – Душанбе. – 2014. – 12 с.
 97. Fuzailov, Iu. M. On the treatment of visceral leishmaniasis in dogs with massive doses of solusurmin / Iu. M Fuzailov, I. I. Ibragimov // *Med Parazitol.* – 1969. – № 38(5). – P. 615-616.
 98. Fuzailov, Iu. M. Metabolism of antimony in children with visceral leishmaniasis treated with solusurmin. II / Iu. M. Fuzailov // *Med Parazitol.* – 1964. – № 33. – P. 438-443.
 99. Mikhailov, V.G. Treatment of infantile visceral leishmaniasis with solusurmin according to material of the parasitological department of the Tashkent City Sanitary-Epidemiological Station / V. G. Mikhailov, M. A. Startseva // *Med Parazitol.* – 1961. – № 30. – P. 563-567.
 100. Официальный сайт Министерства здравоохранения республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Клинические протоколы диагностики и лечения больных с болезнями кожи и подкожной клетчатки. – Режим доступа: <http://minzdrav.gov.by>.

101. Hossain, M. Z. Combination therapy (monomycine and methyluracil) in leishmaniasis cutis / M. Z. Hossain // *Int J Dermatol.* – 1988. – № 27(10). – P. 720-722.
102. Chauhan, P. M. Effect of new diamidines against *Leishmania donovani* infection / P. M. Chauhan, R. N. Iyer, V. Shankhdhar, P. Y. Guru, A. B. Sen // *Indian J Exp Biol.* – 1993. – № 31(2). – P. 196-198.
103. Beniaminov B. A. Aminoquinol in the therapy of the acute necrotising form of cutaneous leishmaniasis / B. A. Beniaminov // *Vestn Dermatol Venerol.* – 1966. – № 40(6). – P. 75-77.
104. Al-Mutairi, N. Tropical medicine rounds: Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapsone, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination / N. Al-Mutairi, M. Alshiltawy, E. M. Khalawany, A. Joshi., B. I. Eassa, Y. Manchanda, S. Gomaa, I. Darwish, M. Rijhwani // *Int J Dermatol.* – 2009. – № 48(8). – P. 862-869.
105. Chaubey, P. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis / P. Chaubey, B. Mishra // *Carbohydr Polym.* – 2014. – № 101. – P. 1101-1108.
106. Ramesh, V. A retrospective study of intravenous sodium stibogluconate alone and in combinations with allopurinol, rifampicin, and an immunomodulator in the treatment of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis / V. Ramesh, J. Kumar, D. Kumar, P. Salotra // *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* – 2010. – № 76(2). – P138-144.
107. Makled, M. Determination of healing response by immunostimulant therapy (levamisole) in cutaneous leishmaniasis / M. Makled, M. Rifaat, M. Azab, S. Makhoulf, A. El-Missery, N. Khalil // *Chemioterapia.* – 1987. – № 6(2 Suppl). – P. 214-216.
108. Shokri, A. Promising antileishmanial activity of novel imidazole antifungal drug luliconazole against *Leishmania major*: In vitro and in silico studies / A. Shokri, M. Abastabar, M. Keighobadi, S. Emami, M. Fakhar, S.H.

- Teshnizi, K. Makimura, A. Rezaei-Matehkolaei, H. Mirzaei // *J Glob Antimicrob Resist.* – 2018. – № 14. – P. 260-265.
109. Hanif, M. M. Intralesional versus oral chloroquine in cutaneous leishmaniasis: comparison of outcome, duration of treatment and total dose of drug / M. M. Hanif, K. Akram, G. Mustafa // *J Coll Physicians Surg Pak.* – 2016. – № 26(4). – P. 260-262.
 110. Carvalho, S. G. Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based β -cyclodextrin complexes in *Leishmania amazonensis* / S. G. Carvalho, L. A. Siqueira, M. S. Zanini, A. P. Dos Santos Matos, C. H. Quaresma, L. M. da Silva, S. F. de Andrade, J. A. Severi, J. C. O. Villanova // *Res Vet Sci.* – 2018. – № 119. – P. 143-153.
 111. Рымаренко, Н. В. Клинический случай висцерального лейшманиоза у ребенка раннего возраста в Крыму / Н. В. Рымаренко, С. В. Усова, Е. А. Крюгер, С. П. Романенко, С. Т. Чветко // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* – 2014. – том 4. – № 4(16). – С. 42-45.
 112. Богадельников, И.В. Лейшманиоз – сюрприз с Востока / И.В. Богадельников, Ю.В. Вяльцева, И.З. Каримов, А.А. Дегтярева, Э.Р. Мазинова, Е.Н. Дядара, Н.Г. Лось-Яценко // *Випадок із практики.* – 2012. – № 3(38). – С. 107-109.
 113. Stahl, H. C. A randomized controlled phase IIb wound healing trial of cutaneous leishmaniasis ulcers with 0.045% pharmaceutical chlorite (DAC N-055) with and without bipolar high frequency electro-cauterization versus intralesional antimony in Afghanistan / H. C. Stahl, F. Ahmadi, U. Schleicher, R. Sauerborn, J. L. Bermejo, M. L. Amirih, I. Sakhayee, C. Bogdan, K. W. Stahl // *BMC Infect Dis.* – 2014. – № 14. – P. 619.
 114. Hilerowicz, Y. Fractional ablative carbon dioxide laser followed by topical sodium stibogluconate application: A treatment option for pediatric cutaneous leishmaniasis / Y. Hilerowicz, A. Koren, J. Mashiah, O. Katz, E. Sprecher, O. Artzi // *Pediatr Dermatol.* – 2018. – № 35(3). – P. 366-369.

115. Ben Salah, A. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis / A. Ben Salah, N. Ben Messaoud, E. Guedri, A. Zaatour, N. Ben Alaya, J. Bettaieb, A. Gharbi, N. Belhadj Hamida, A. Boukthir, S. Chlif, K. Abdelhamid, Z. El Ahmadi, H. Louzir, M. Mokni, G. Morizot, P. Buffet, P. L. Smith, K. M. Kopydlowski, M. Kreishman-Deitrick, K. S. Smith, C. J. Nielsen, D. R. Ullman, J. A. Norwood, G. D. Thorne, W. F. McCarthy, R. C Adams, R. M. Rice, D. Tang, J. Berman, J. Ransom, A. J. Magill, M. Grogil // *N Engl J Med.* – 2013. – № 368(6). – P. 524-532.
116. Somaratne, V. N. Randomized, double-blind study on intralesional metronidazole versus intralesional sodium stibogluconate in *Leishmania donovani* cutaneous leishmaniasis / V. N. Somaratne, R. R. Ranawaka, H. M. Jayaruwan, D. M. Wipuladasa, S. H. P. de Silva // *J Dermatolog Treat.* – 2018. – № 7. – P. 1-5.
117. Vakil, N. H. Pharmacotherapy for leishmaniasis in the United States: focus on miltefosine / N. H. Vakil, N. Fujinami, P. J. Shah // *Pharmacotherapy.* – 2015. – № 35(5). – P. 536-545.
118. Wijnant, G. J. Local skin inflammation in cutaneous leishmaniasis as a source of variable pharmacokinetics and therapeutic efficacy of liposomal amphotericin B / G. J. Wijnant, K. Van Bocxlaer, A. Fortes Francisco, V. Yardley, A. Harris, M. Alavijeh, S. Murdan, S. L. Croft // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – № 6. – P. 631.