

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 63



7-8'2018

Научно-практический журнал

Противовирусный препарат

МНН Риамиловир

ТРИАЗАВИРИН®

*Грипп теперь
не страшен с ним!*



ТРИАЗАВИРИН - оригинальный препарат группы азолоазинов. Препарат этиотропного действия с широким спектром противовирусной активности.

ТРИАЗАВИРИН рекомендован Министерством здравоохранения РФ в качестве препарата с прямым противовирусным действием при лечении гриппа в амбулаторных и стационарных условиях*.

* Клинические рекомендации Минздрава РФ Грипп у взрослых, 2017 год

(343) 270-75-71, 270-75-00
www.triazavirin.ru
Info@triazavirin.ru



ЗАВОД МЕДСИНТЕЗ

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

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

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2018

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: 2018

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 63

7—8'2018

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Оригинальные статьи

Original Papers

Лавренов С. Н., Симонов А. Ю., Панов А. А., Лакатос С. А.,
Исакова Е. Б., Цвигун Е. А., Бычкова О. П., Татарский В. В.,
Иванова Е. С., Мирчинк Е. П., Королев А. М., Тренин А. С.
Новые антимикробные вещества — гибридные
производные малеимидов и трииндолилметанов:
синтез и биологическая активность

4 Lavrenov S. N., A. Yu. Simonov, Panov A. A., Lakatosh S. A.,
Isakova E. B., Tsvigun E. A., Bychkova O. P., Tatarskiy V. V.,
Ivanova E. S., Mirchink E. P., Korolev A. M., Trenin A. S.
Synthesis and Biological Activity of New Antimicrobial
Agents — Hybrid Derivatives
of Maleimides and Triindolylmethanes

Гостев В. В., Калиногорская О. С., Юдин С. М.,
Дмитренко О. А., Кудрявцева А. В., Сидоренко С. В.
Полиморфизм генов, участвующих в сборке клеточной
стенки у метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus*
со сниженной чувствительностью к ванкомицину

11 Gostev V. V., Kalinogorskaya O. S., Dmitrenko O. A.,
Yudin S. M., Kudryavtseva A. V., Sydorenko S. V.
Cell Wall Biosynthesis Genes Variability
in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*
with Reduced Vancomycin Susceptibility

Алексеева А. И., Халанский А. С., Федосеева В. В.,
Гореликов П. Л., Гельперина С. Э.
Влияние донора оксида азота на противоопухолевую
активность доксорубина в отношении
экспериментальной глиобластомы крыс

17 Alekseeva A. I., Khalansky A. S., Fedoseeva V. V.,
Gorelikov P. L., Gelperina S. E.
Potentiating Effect of Nitric Oxide Donor
on Antitumor Activity of Doxorubicin
in Glioblastoma-Bearing Rats

Кузнецова Ю. К.
Исследование эффективности препаратов
для терапии зоонозного кожного лейшманиоза
in vivo на лабораторной модели

22 Kuznetsova Yu. K.
Study of the Effectiveness of Drugs for the Treatment
of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis
in vivo on a Laboratory Model

Тюрина А. В., Гаевская Н. Е., Селянская Н. А., Егиазарян Л. А.,
Погожова М. П., Головин С. Н., Пасюкова Н. И.
Активность препарата бактериофагов
в отношении антибиотикорезистентных штаммов
холерных вибрионов El Tor

29 Tyurina A. V., Gaevskaya N. E., Selyanskaya N. A., Egiazaryan L. A.,
Pogozhova M. P., Golovin S. N., Pasyukova N. I.
Activity of Bacteriophage Preparation in Relation
to Antibiotic-Resistant El Tor Strain
of *Vibrio Cholerae*

В помощь практикующему врачу

Guidelines for Practitioners

Полонская А. В., Корниенко М. А., Манолов А. И.,
Купцов Н. С., Смирнов Г. Б., Любасовская Л. А.,
Припутневич Т. В., Шитиков Е. А., Ильина Е. Н.
Вариабельность генов рекомбиназ
и *mecA* стафилококковой хромосомной кассеты
Staphylococcus haemolyticus

33 Polonskaya A. V., Kornienko M. A., Manolov A. I.,
Kuptsov N. S., Smirnov G. B., Lyubasovskaya L. A.,
Priputnevich T. V., Shitikov E. A., Ilina E. N.
Variability of Recombinase Genes
and Staphylococcal Cassette Chromosome *mecA*
of *Staphylococcus Haemolyticus*

Маркелова Н. Н., Тутельян А. В.,
Писарев В. М., Гапонов А. М.,
Некоторые закономерности формирования
персистирующих форм клинических изолятов
грамотрицательных бактерий

41 Markelova N. N., Tutelyan A. V.,
Pisarev V. M., Gaponov A. M.,
Some Regularities of Persistent Forms
of Clinical Isolates of Gram-Negative
Bacteria Formation

* Журнал входит в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Веревищников В. К., Шемякина Е. К., Сабитов А. У., Бацкалевич Н. А. Современная этиотропная терапия гриппа и ОРВИ у взрослых больных с отягощённой преморбидной патологией	47	Verevshchikov V. K., Shemyakina E. K., Sabitov A. U., Batskalevich N. A. Modern Etiotropic Therapy of Influenza and ARVI in Adult Patients with Premorbid Pathology
Татауршчикова Н. С. Циклоферон в лечении иммунокомпрометированных пациентов с аллергическим ринитом	51	Tataurshchikova N. S. Cycloferon in the Treatment of Immunocompromised Patients with Allergic Rhinitis
Ни О. Г., Очаковская И. Н., Шабанова Н. Е., Пенжоян Г. А., Модель Г. Ю., Яковлев С. В. Анкетирование врачей для определения исходного уровня знаний как механизм повышения эффективности образовательных мероприятий в области рациональной антимикробной терапии	55	Ni O. G., Ochakovskaya I. N., Shabanova N. E., Penzhoyan G. A., Model G. Yu., Yakovlev S. V. Survey of Physicians to Assess the Initial Level of Knowledge as a Mechanism for Increasing the Efficiency of Educational Programs in the Field of Rational Antimicrobial Therapy
Стандартизация и контроль лекарственных средств		Drug Standardization and Control
Олефир Ю. В., Семёнова Е. Н., Кулешова С. И., Саканян Е. И., Процак С. А. Применение турбидиметрического метода анализа для стандартизации и оценки качества антибиотиков группы аминогликозидов и лекарственных препаратов на их основе	62	Olefir Yu. V., Semenova E. N., Kuleshova S. I., Sakanyan E. I., Protsak S. A. Turbidimetric Method for Standardization and Quality Control of Aminoglycoside Antibiotics and Aminoglycoside-Based Products
Обзоры		Reviews
Беседнова Н. Н., Смолина Т. П., Андрюков Б. Г., Кузнецова Т. А., Михайлов В. В., Звягинцева Т. Н. Экзополисахариды морских бактерий: перспективы применения в медицине	67	Besednova N. N., Smolina T. P., Andryukov B. G., Kuznetsova T. A., Mikhailov V. V., Zvyagintseva T. N. Exopolysaccharides of Marine Bacteria: Prospects for Use in Medicine
Мамичев И. А., Богуш Т. А., Богуш Е. А., Терентьева Н. С., Полоцкий Б. Е., Давыдов М. М. Белок микротрубочек β_{III} -тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках	79	Mamichev I. A., Bogush T. A., Bogush E. A., Terentyeva N. S., Polotsky B. E., Davydov M. M. Microtubule Protein β_{III} -Tubulin: Structure, Expression and Functions in Normal and Tumor Cells

Новые антимикробные вещества — гибридные производные малеимидов и трииндолилметанов: синтез и биологическая активность

С. Н. ЛАВРЕНОВ¹, А. Ю. СИМОНОВ¹, А. А. ПАНОВ¹, С. А. ЛАКАТОШ¹, Е. Б. ИСАКОВА¹, Е. А. ЦВИГУН¹, О. П. БЫЧКОВА¹, В. В. ТАТАРСКИЙ², Е. С. ИВАНОВА², Е. П. МИРЧИНК¹, А. М. КОРОЛЕВ¹, А. С. ТРЕНИН^{1*}

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

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва

Synthesis and Biological Activity of New antimicrobial Agents — Hybrid Derivatives of Maleimides and Triindolylmethanes

S. N. LAVRENOV¹, A. YU. SIMONOV¹, A. A. PANOV¹, S. A. LAKATOSH¹, E. B. ISAKOVA¹, E. A. TSVIGUN¹, O. P. BYCHKOVA¹, V. V. TATARSKIY², E. S. IVANOVA², E. P. MIRCHINK¹, A. M. KOROLEV¹, A. S. TRENIN^{1*}

¹ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

² N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Разработаны методы синтеза гибридных молекул, сочетающих в себе как структуру высокоактивных антимикробных соединений — трис(1-алкилиндол-3-ил)метилиев, так и 3-(индол-1-ил)малеимидов, ранее проявивших активность на некоторые протеинкиназы. Основная цель исследования состояла в изучении влияния заместителей на активность соединений в отношении различных тест-микроорганизмов, а также на их токсичность в отношении клеток человека. Благодаря введению фрагмента малеимида, например, в некоторых случаях удалось снизить цитотоксичность практически в 40 раз по сравнению с исходным прототипом. При этом антимикробная активность нового вещества осталась примерно на том же уровне.

Ключевые слова: гибридные антибиотики, производные трииндолилметана, малеимиды, химический синтез, антибактериальная и антифунгальная активность *in vitro*, связь структура — биологическая активность.

Methods for the synthesis of hybrid molecules that combine the structure of a highly active antimicrobial compounds — tris(1-alkylindol-3-yl)methylum as well as 3-(indol-1-yl)maleimides that previously showed activity against some protein kinases have been developed. The main purpose of this study was to investigate the influence of substituents on the activity of compounds against different test microorganisms, as well as their toxicity on human cells. For example, with the introduction of a fragment of maleimide, it was possible to reduce cytotoxicity by almost 40 times compared to the original prototype in some cases. At the same time, antimicrobial activity of the new substance remained approximately at the same level.

Keywords: hybrid antibiotics, triindolylmethane derivatives, maleimides, chemical synthesis, antibacterial and antifungal activity *in vitro*, relations between structure and biological activity.

Введение

В последние годы положение в области терапии инфекционных заболеваний значительно осложнилось в связи с широким распространением возбудителей, устойчивых к известным антибиотическим препаратам [1, 2]. Лечение таких инфекций при помощи современного арсенала антибиотиков оказывается невозможным или малоэффективным. Если решение проблемы не будет найдено, смертность от инфекционных заболеваний у людей и сельскохозяйственных животных в обозримом будущем может вернуться к уровню XIX века. Для решения этой проблемы предлага-

ется использовать как методы профилактики развития лекарственной устойчивости с применением рекомендаций по рациональному использованию антибиотиков, так и разработку новых антимикробных средств, способных к преодолению лекарственной устойчивости. Последнее направление является одной из важнейших задач современной медицинской химии [3].

Наиболее перспективным направлением химической модификации является получение молекул, имеющих низкую токсичность в отношении клеток человека и сохраняющих при этом высокую активность в действии на устойчивые штаммы возбудителей. Новым и интересным подходом в дизайне антимикробных препаратов является создание гибридных молекул, объединяющих в своей структуре два или более струк-

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБНУ «НИИНА»; e-mail: as-trenin@mail.ru

турных фрагмента разных антимикробных средств, обладающих различиями в механизме действия [4].

Цель работы — синтез новых производных и изучение связи структура — биологическая активность среди ряда гибридных молекул, сочетающих в структуре фрагменты трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия и 3,4-дизамещенных пиррол-2,5-дионов (малеимидов).

Материал и методы

Получение и очистка новых соединений, анализ их физико-химических характеристик, реактивы и материалы. Синтез соединений 1, 2 и 3 описан в наших предыдущих исследованиях [5–7]. Методы получения и очистки новых соединений (4a–4f, 5a–5d, 6a–6d, 7a–7d, 9a–9f), а также их физико-химические характеристики представлены ниже. Схемы синтеза указанных соединений представлены в разделе Результаты и обсуждение. Используемые для их синтеза соединения 1-пропилиндол (8a), 2-метил-1-пропилиндол (8b), 1-бутил-2-метилиндол (8c), другие реагенты и растворители были получены из коммерческих источников.

Получение и характеристика новых оригинальных соединений

1-(4-Бромо-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-карбальдегид (6a). К раствору POCl_3 (0,93 мл 10 мМ) в ДМФА (50 мл) при перемешивании добавляли 3-бром-4-(1H-индол-1-ил)-1H-пирроло-2,5-дион (5a) (2,5 г, 8,5 мМ). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре 2 ч. Реакционную массу при перемешивании порционно выливали в 5% водный раствор Na_2CO_3 (250 мл). После полной нейтрализации экстрагировали этилацетатом (2×50 мл), экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили (Na_2SO_4) и упаривали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (элюент: петролейный эфир — этилацетат 5:1). Получили 7a в виде порошка жёлтого цвета (1,43 г, 4,5 мМ, 53%).

ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_3^+\text{H}^+$ 318,9713, найдено 318,9750

^1H ЯМР*, λ , м. д. (J, Гц): 7,40 (1H, dt, J = 6,9, 1,3), 7,43 (1H, dt, J = 7,3, 1,7), 7,56 (1H, d, J = 7,5), 8,21 (1H, dd, J = 6,6, 1,5), 8,45 (1H, s), 10,12 (1H, s, NH), 11,91 (1H, s, CONH);

^{13}C ЯМР, λ , м. д.: 113,8, 120,7, 121,4, 124,5, 124,7, 125,2, 133,6, 135,7, 139,7, 164,8 (C=O), 165,7 (C=O), 166,3 (CONH)

1-(4-Амино-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-карбальдегид (7a). К раствору 6a (1,3 г, 4 мМ) в ДМФА (25 мл) добавляли водный раствор аммиака (25%, 0,3 мл, 20 мМ). Реакционную массу перемешивали 24 ч при комнатной температуре, затем выливали в воду (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×25 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили (Na_2SO_4) и упаривали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (элюент: петролейный эфир — этилацетат 3:1). Получали 7a в виде порошка жёлтого цвета (0,62 г, 2,4 мМ, 61%). ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3^+\text{Na}^+$: 278,0536, найдено 278,0564

^1H ЯМР*, λ , м. д. (J, Гц): 7,30 (1H, t, J = 7,3), 7,32 (1H, t, J = 7,29), 7,47 (1H, d, J = 7,3), 8,17 (1H, d, J = 7,3), 8,18 (2H, s, NH₂), 8,26 (1H, s), 10,0 (1H, s), 10,87 (1H, s, NH)

3-Амино-4-(3-(бис(1-пропил-1H-индол-3-ил)метил)-1H-индол-1-ил)-1H-пиррол-2,5-дион (9a). К раствору 7a (0,5 г, 1,9 мМ) в метаноле (50 мл) добавляли 8a (0,71 г, 4,5 мМ), $\text{Dy}(\text{OTf})_3$ (5 мг). Реакционную массу перемешивали при нагревании с обратным холодильником в течение 10 ч. Охлаждали до комнатной температуры, упаривали в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате, (50 мл) промывали насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили (Na_2SO_4) и упаривали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии

(элюент: петролейный эфир — этилацетат 3:1). Получали 4 в виде порошка красного цвета (0,88 г, 1,6 мМ, 84%).

^1H ЯМР*, λ , м. д. (J, Гц): 0,75–0,8 (6H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,65–1,75 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,0–4,1 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6,09 (1H, s), 6,89 (3H, t, J = 7,7), 6,97 (2H, t, J = 7,7), 7,04–7,14 (8H, m), 7,29 (2H, d, J = 8,1), 7,39–7,50 (3H, m), 10,47 (1H, s, NH)

^{13}C ЯМР, λ , м. д.: 11,1 (2C), 23,1 (2C), 30,7 (C-метан), 46,9 (2C), 98,6, 109,7 (2C), 110,9, 116,9 (2C), 118,0 (2C), 119,0, 119,5, 119,6 (2C), 119,7, 120,7 (2C), 121,5, 127,0, 127,1 (2C), 127,3 (2C), 136,2 (2C), 136,9, 141,9, 167,1 (C=O), 169,9 (C=O).

(1-(4-Амино-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-ил)бис(1-пропил-1H-индол-3-ил)метил гидрохлорид (4a). К раствору 9a (0,5 г, 0,9 мМ) в метаноле (50 мл) добавляли $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,35 г, 5 мМ). Реакционную массу нагревали при перемешивании с обратным холодильником в течение 2 ч, охлаждали и выливали в воду (300 мл). Экстрагировали бутанолом-1 (2×30 мл). Экстракт промывали водой (2×50 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл), упаривали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (элюент: хлористый метилен — метанол 25:1). Получили 4a в виде порошка красного цвета (0,47 г, 0,8 мМ, 89%). ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_2^+\text{H}^+$ 554,2551, найдено 554,2533. ВЭЖХ Rt = 5,44 мин, 98,5%.

^1H ЯМР*, λ , м. д. (J, Гц): 1,01 (6H, t, J = 7,3, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,99–2,04 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,45 (4H, t, J = 6,9, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7,02–7,04 (1H, m), 7,13–7,18 (5H, m), 7,40 (4H, t, J = 7,8), 7,44 (2H, t, J = 7,8), 7,53 (1H, d, J = 8,2), 7,75 (2H, s), 7,87 (2H, d, J = 8,3), 8,27 (1H, s), 8,56 (2H, s, NH₂), 10,59 (1H, s, NH)

3-(Диметиламино)-4-(1H-индол-1-ил)-1H-пирроло-2,5-дион (6b). К раствору 5a (3 г, 10,3 мМ) в ДМФА (50 мл) добавляли водный раствор HNMe_2 (40%, 2,3 мл, 21 мМ). Реакционную массу перемешивали 24 ч при комнатной температуре. Выливали в воду (300 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили (Na_2SO_4) и упаривали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (элюент: петролейный эфир — этилацетат 3:1). Получили 6b в виде порошка жёлтого цвета (1,52 г, 5,9 мМ, 58%). ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2^+\text{H}^+$: 256,1081, найдено 256,1101

^1H ЯМР*, λ , м. д. (J, Гц): 2,85 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 6,59 (1H, dd, J = 3,3, 0,8), 7,08 (1H, dt, J = 7,3, 0,8), 7,17 (1H, dt, J = 9,1, 1,0), 7,29 (1H, d, J = 6,9), 7,30 (1H, d, J = 3,8), 7,59 (1H, d, J = 7,7), 10,69 (1H, s, NH)

^{13}C ЯМР, λ , м. д.: 39,7 (2C), 99,0, 102,5, 110,7, 119,9, 120,4, 122,0, 127,6, 131,6, 139,0, 143,6, 166,5 (C=O), 168,7 (C=O).

3-(Диметиламино)-4-(1H-индол-1-ил)-1-метил-1H-пирроло-2,5-дион (6c). Продукт получали аналогично 6b, из 5b, как кристаллический порошок жёлтого цвета с выходом 62%. ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2^+\text{H}^+$: 256,1081, найдено 256,1101

^1H ЯМР*, λ , м. д. (J, Гц): 2,85 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2,98 (3H, s, NCH_3), 6,57 (1H, d, J = 3,6), 7,10 (1H, t, J = 7,5), 7,15 (1H, t, J = 8,9), 7,30 (1H, d, J = 6,9), 7,31 (1H, d, J = 3,8), 7,59 (1H, d, J = 7,9)

3-(Диэтиламино)-4-(1H-индол-1-ил)-1H-пирроло-2,5-дион (6d). Получали аналогично 6b, из 5a и диэтиламина, как порошок жёлтого цвета с выходом 68%. ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2^+\text{H}^+$: 284,1394, найдено 284,1421.

^1H ЯМР*, λ , м. д. (J, Гц): 0,94 (6H, t, J = 6,5, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,23–3,30 (4H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 6,59 (1H, d, J = 3,1), 7,09 (1H, t, J = 7,1), 7,16 (1H, t, J = 8,1), 7,24 (1H, d, J = 8,1), 7,34 (1H, d, J = 2,5), 7,60 (1H, d, J = 7,7), 10,71 (1H, s, NH)

^{13}C ЯМР, λ , м. д.: 13,7 (2C), 44,7 (2C), 98,7, 102,5, 110,5, 119,9, 120,5, 121,9, 127,6, 131,2, 138,5, 141,7, 166,4 (C=O), 168,9 (C=O).

1-(4-(Диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-карбальдегид (7b). Получали аналогично 7a из 6b, порошок жёлтого цвета, выход 81%. ESI-HRMS: рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3^+\text{H}^+$: 284,1030, найдено 284,1106.

¹H ЯМР*, λ, м. д. (J, Гц): 2,89 (6H, s, N(CH₃)₂), 7,31 (1H, t, J = 7,0), 7,36 (1H, t, J = 7,0), 7,50 (1H, d, J = 7,4), 8,15 (1H, d, J = 7,5), 8,28 (1H, s), 10,0 (1H, s), 10,84 (1H, s, NH)

¹³C ЯМР, λ, м. д.: 40,1 (2C), 97,3, 111,9, 118,6, 121,0, 123,0, 123,7, 124,4, 140,4, 143,5, 143,9, 166,0 (C=O), 168,2 (C=O), 185,3 (COH).

1-(4-(Диметиламино)-1-метил-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-карбальдегид (7c). Получали аналогично 7a из 6c, порошок жёлтого цвета, выход 83%. ESI-HRMS: рассчитано для C₁₅H₁₃N₃O₃⁺H⁺: 284,1030, найдено 284,1106.

¹H ЯМР*, λ, м. д. (J, Гц): 2,87 (6H, s, N(CH₃)₂), 2,97 (3H, s, NCH₃), 7,30 (1H, t, J = 7,1), 7,34 (1H, t, J = 7,3), 7,49 (1H, d, J = 7,5), 8,12 (1H, d, J = 7,7), 8,20 (1H, s), 10,6 (1H, s).

1-(4-(Диэтиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-карбальдегид (7d). Получали аналогично 7a из 6d, жёлтый порошок, выход 71%. ESI-HRMS: рассчитано для C₁₇H₁₇N₃O₃⁺H⁺: 312,1343, найдено 312,1376.

¹H ЯМР*, λ, м. д. (J, Гц): 0,89—1,04 (6H, m, N(CH₂CH₃)₂), 3,26—3,40 (4H, m, N(CH₂CH₃)₂), 7,29 (1H, t, J = 6,8), 7,32 (1H, t, J = 7,0), 7,43 (1H, d, J = 7,3), 8,13 (1H, d, J = 8,1), 8,37 (1H, s), 9,97 (1H, s), 10,80 (1H, s, NH)

¹³C ЯМР, λ, м. д.: 13,7 (2C), 45,1 (2C), 96,8, 111,6, 118,7, 121,1, 123,1, 123,7, 124,4, 139,9, 142,1, 143,4, 165,9 (C=O), 166,4 (C=O), 185,2 (COH).

(1-(4-(Диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-ил)бис(1-пропил-1H-индол-3-ил)метил-ий гидрохлорид (4b). Получали аналогично 4a, красный порошок, выход 86%. ESI-HRMS: рассчитано для C₃₇H₃₆N₅O₂⁺: 582,2864, найдено 582,2915. ВЭЖХ анализ Rt = 6,75 мин, 95,7%.

¹H ЯМР**, λ, м. д. (J, Гц): 1,00 (6H, t, J = 6,4, NCH₂CH₂CH₃), 1,99—2,03 (4H, m, N(CH₂CH₂CH₃), 3,12 (6H, s, N(CH₃)₂), 4,45 (4H, t, J = 7,0, N(CH₂CH₂CH₃), 7,02-7,06 (2H, m), 7,15 (3H, t, J = 7,0), 7,43 (3H, t, J = 7,3), 7,67 (1H, d, J = 7,3), 7,86 (2H, d, J = 7,3), 8,32 (1H, s), 8,47 (2H, s), 10,71 (1H, s, NH).

(1-(4-(Диметиламино)-1-метил-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-ил)бис(2-метил-1-пропил-1H-индол-3-ил)метил-ий гидрохлорид (4d). Получали аналогично 4a, красный порошок, выход 91%. ESI-HRMS: рассчитано для C₄₀H₄₂N₅O₂⁺: 624,3333, найдено 624,3353. ВЭЖХ анализ Rt = 19,8 мин, 98,4%.

¹H ЯМР**, λ, м. д. (J, Гц): 1,01 (6H, t, J = 7,9, N(CH₂CH₂CH₃), 1,89—1,90 (4H, m, N(CH₂CH₂CH₃), 2,97 (3H, s, NCH₃), 3,08 (6H, s, N(CH₃)₂), 3,12 (6H, s, 2-CH₃), 4,37—4,41 (4H, m, N(CH₂CH₂CH₃), 6,75—6,85 (1H, m), 6,90—6,96 (1H, m), 7,01—7,04 (2H, m), 7,05—7,09 (1H, m), 7,14—7,19 (1H, m), 7,32—7,34 (2H, m), 7,41 (1H, t, J = 6,9), 7,67 (1H, d, J = 8,2), 7,77 (2H, d, J = 8,3), 8,16 (1H, s).

(1-(4-(Диметиламино)-1-метил-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-ил)бис(1-пропил-1H-индол-3-ил)метил-ий гидрохлорид (4c). Получали аналогично 4a, красный порошок, выход 93%. ESI-HRMS: рассчитано для C₃₈H₃₈N₅O₂⁺: 596,3020, найдено 596,3020. ВЭЖХ анализ Rt = 8,58 мин, 96,2%.

¹H ЯМР**, λ, м. д. (J, Гц): 1,01 (6H, t, J = 7,4, NCH₂CH₂CH₃), 1,99—2,03 (4H, m, N(CH₂CH₂CH₃), 2,98 (3H, s, NCH₃), 3,15 (6H, s, N(CH₃)₂), 4,46 (4H, t, J = 6,9, N(CH₂CH₂CH₃), 7,00—7,03 (2H, m), 7,06—7,07 (1H, m), 7,15 (3H, t, J = 7,3), 7,40—7,45 (3H, m), 7,69 (1H, d, J = 8,3), 7,87 (2H, d, J = 8,3), 8,30 (1H, s), 8,49 (2H, s).

(1-(4-(Диэтиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-ил)бис(2-метил-1-пропил-1H-индол-3-ил)метил-ий гидрохлорид (4e). Получали аналогично 4a, красный порошок, выход 90%. ESI-HRMS: рассчитано для C₄₁H₄₄N₅O₂⁺: 638,3490, найдено 638,3619. ВЭЖХ анализ Rt = 10,35 мин, 95,4%.

¹H ЯМР**, λ, м. д. (J, Гц): 1,02 (6H, t, J = 6,8, N(CH₂CH₂CH₃), 1,07 (6H, t, J = 6,0, NCH₂CH₂CH₃), 1,90 (4H, t, J = 5,5, NCH₂CH₂CH₃), 2,23—2,26 (4H, m, N(CH₂CH₃)₂), 3,49 (6H, s, 2-

Me), 4,39—4,41 (4H, m, NCH₂CH₂CH₃), 6,80—6,83 (1H, m), 6,93—6,96 (1H, m), 7,00—7,03 (2H, m), 7,06—7,10 (1H, m), 7,15—7,17 (1H, m), 7,32—7,35 (2H, m), 7,49—7,41 (1H, m), 7,59 (1H, d, J = 8,3), 7,77 (2H, d, J = 7,7), 8,26 (1H, s), 10,75 (1H, s, NH).

Бис(1-бутил-2-метил-1H-индол-3-ил)(1-(4-(диэтиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)-1H-индол-3-ил)метил-ий гидрохлорид (4f). Получали аналогично 4a, красный порошок, выход 88%. ESI-HRMS: рассчитано для C₄₁H₄₄N₅O₂⁺: 666,3803, найдено 666,3846. ВЭЖХ анализ Rt = 13,57 мин, 95,1%.

¹H ЯМР**, λ, м. д. (J, Гц): 0,97 (12H, t, J = 7,06, N(CH₂CH₃)₂, NCH₂CH₂CH₃), 1,39—1,47 (4H, m,), 1,78—1,83 (4H, m), 2,17—2,18 (4H, m, N(CH₂CH₃)₂), 3,36 (6H, s, 2-CH₃), 4,41—4,42 (4H, m, NCH₂CH₂CH₃), 6,64—6,69 (1H, m), 6,77—6,82 (1H, m), 6,86 (1H, d, J = 6,9), 6,97—7,04 (2H, m), 7,08—7,16 (1H, m), 7,25 (1H, t, J = 7,1), 7,32—7,39 (2H, m), 7,44 (1H, t, J = 8,9), 7,86 (1H, t, J = 8,5), 7,77—7,82 (1H, m), 8,36 (1H, s), 11,03 (1H, s, NH).

Тестированию подвергали растворы полученных соединений в диметилсульфоксиде (ДМСО). Концентрация исходных растворов в ДМСО составляла от 1,6 до 6,4 мг/мл. Из нее получали серию двукратных разведений в том же растворителе, которые в дальнейшем использовались для внесения в водные питательные среды при тестировании антибиотиков. Конечная концентрация растворителя (ДМСО) в эксперименте по выявлению биологической активности составляла 1% [6, 8].

Анализ физико-химических характеристик соединений. Спектры ЯМР регистрировали на двух приборах: «Varian VXR-400»* при частоте 400 МГц (ЯМР 1H) и при 100 МГц (ЯМР 13C), используя сигнал растворителя в качестве стандарта и на приборе Bruker Avance II 600** с рабочей частотой по протонам 600,22 Mhz. Эксперименты проводились при температуре 353K с термостатированием каждого образца в течение 30 мин. Масс-спектры высокого разрешения ESI регистрировали на приборе «microTOF-Q II» («Bruker Daltonics GmbH», Германия). Растворы образцов (0,1 мг×мл⁻¹ в MeOH или MeCN) прямо вводили в ESI-источник с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 3 мкл×мин⁻¹. Положительно и отрицательно заряженные ионы анализировали при следующих условиях: напряжение на капилляре —4,5 и +4 кВ, соответственно, давление азота в небулайзере (распылителе) 0,4 Бар (5,8 psi), скорость потока осушающего газа 4,0 л/мин и температура источника 180°C. Аналитическое ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа «Shimadzu LC10» на колонке Gemini 110A-C18 размером 4,6×250 мм с зернением 5 мкм («Phenomenex», США). Детектирование проводили на спектрофотометре «Shimadzu UV#VIS 10A» при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения. Подвижная фаза состояла из 0,2% HCOONH₄ (A) и ацетонитрила (B). Элюция проходила в градиентном режиме, при котором процентное содержание ацетонитрила (B) изменялось от 50 до 90% за 20 мин и сохранялось равным 90% — 10 мин при скорости потока — 1 мл×мин⁻¹. Объём петли инжектора — 10 мкл, образцы вводили до концентрации 0,01—0,05 мг×мл⁻¹ в смеси ацетонитрил — вода (1:1).

Препараты сравнения, материалы и реактивы. Препаратами сравнения служили левофлоксацин (Лф, «Белмедпрепараты РУП», Беларусь) и амфотерицин В (Ам В, «Sigma», США). В работе использовали одноразовые стерильные 96-луночные планшеты (Пан-Эко, Россия), пластиковые чашки Петри, пластиковые стерильные пипетки, пробирки (Пан-Эко, Россия), одноканальные и многоканальные дозаторы ВНИИ БП, Россия, фильтры Sterivex-GV 0,22 мкм (Millipore, США).

Для оценки микробных культур, имевших разную чувствительность к антибиотикам, использовали препараты антибиотиков отечественных и зарубежных компаний, а также антибиотики, полученные в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе.

Микробные штаммы, питательные среды, условия культивирования. В работе использовали клинические изоляты бактерий, полученные из клиник и из музея штаммов Лаборато-

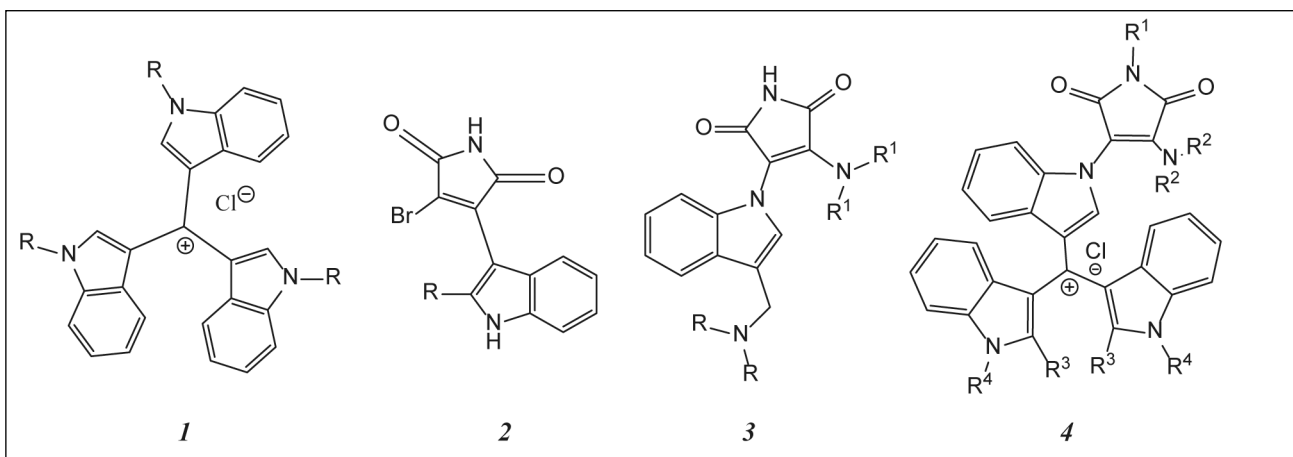


Рис. 1. Химическая структура некоторых биологически активных трииндолилметилиев и производных малеимида.

1 — R = H (турбомицин A) (a), n-пропил (b), n-бутил (c); **2** — R = алкил, арил; **3** — R = алкил, R' = алкил; **4** — R' = H, CH₃, R² = H, алкил, R³ = H, CH₃, R⁴ = H, алкил.

рии проблем клинической микробиологии и контроля за госпитальными инфекциями ПМГМУ им. И. М. Сеченова, а также коллекционные штаммы грамположительных, грамотрицательных бактерий и грибов. Использовали клинические изоляты грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 10, *Staphylococcus aureus* 100KC, *Staphylococcus aureus* 3798; коллекционные культуры грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 700699; коллекционные культуры грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; коллекционные культуры дрожжей *Candida albicans* ATCC 14053 и грибов *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Определение антимикробной активности тестируемых соединений in vitro. Определение антимикробной активности, проводили путём выявления их минимальной подавляющей концентрации (МПК) методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде с использованием 96-луночных стерильных планшетов. Работу с бактериями проводили в питательной среде Мюллера-Хинтон, с грибами — в среде RPMI 1640 с L-глутамином, без бикарбоната натрия. Определение, подробно описанное ранее [6, 8], проводили в соответствии с требованиями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI/NCCLS) и методическими указаниями по изучению активности фармакологических веществ [9–12].

Определение цитотоксического действия тестируемых соединений в отношении клеточных линий человека. Цитотоксическое действие тестируемых соединений определяли с помощью МТТ-теста, с использованием клеточных линий НЕК-293 (эпителий эмбриональных почек человека) и ПФЧ-hTERT (постнатальные фибробласты человека, иммортализованные hTERT). Клетки линий НЕК-293 или ПФЧ культивировали в модифицированной среде Дульбекко (DMEM), содержащей 2 mM L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Инкубацию проводили в увлажненной атмосфере 5% CO₂ при 37°C. В эксперименте использовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста. Для исследования цитотоксичности соединений в ячейки 96-луночных планшетов вносили по 190 мкл суспензии клеток (~2 тыс. клеток на лунку) и инкубировали 16 ч. В день эксперимента готовили серийные разведения тестируемых соединений в ДМСО (исходный раствор — 10 mM в 100% ДМСО). В дальнейшем разведения проводили в питательной среде. Конечные концентрации соединений в опыте составляли 50, 17, 5,6, 1,85, 0,61, 0,21, 0,07, 0,02, 0,008, 0,0025 мкМ. Конечная концентрация растворителя (ДМСО) составляла

1%. Каждая концентрация была представлена в 3 повторах. Контролем служили лунки, не содержащие тестируемых препаратов. Инкубацию клеток с тестируемыми соединениями проводили в течение 72 ч. После окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл раствора МТТ в ростовой среде (5 мг/мл). Клетки инкубировали 2 ч до развития фиолетовой окраски, после чего культуральную среду удаляли. В лунки вносили по 100 мкл ДМСО и суспендировали осадок. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Thermo Scientific Multiscan FC при длине волны 570 нм. За 100% выживаемость клеток принимали значения оптической плотности в лунках без добавления тестируемых соединений (контроль). Процент выживаемости клеток, инкубированных с тестируемыми соединениями, вычисляли делением оптической плотности в соответствующей лунке (среднее 3 независимых измерений) на значение оптической плотности в контроле. Оценивали концентрацию препаратов, вызывающую гибель 50% клеток (IC₅₀) и выражали её в мкг/мл.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было начато изучение связи структура—активность в ряду представителей нового класса антибактериальных агентов — трис(1-алкилиндол-3-ил)метилиев (1), имеющих структурное сходство с природным антибиотиком турбомицином A (1a) (рис. 1) [5–7]. Среди вновь полученных соединений был обнаружен ряд веществ, обладающих высокой (субмикромольной) активностью, в том числе на мультирезистентные штаммы золотистого стафилокока. Полученные нами первые симметричные алкильные производные были высокоактивны в отношении бактерий, однако при этом имели низкую избирательность действия. Их структура нуждалась в совершенствовании.

Фрагмент 3-(индол-3-ил)малеимида является основой структуры веществ типа (2), проявивших антибактериальную активность на резистентных штаммах *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis* и некоторых других грамположительных бактерий [13].

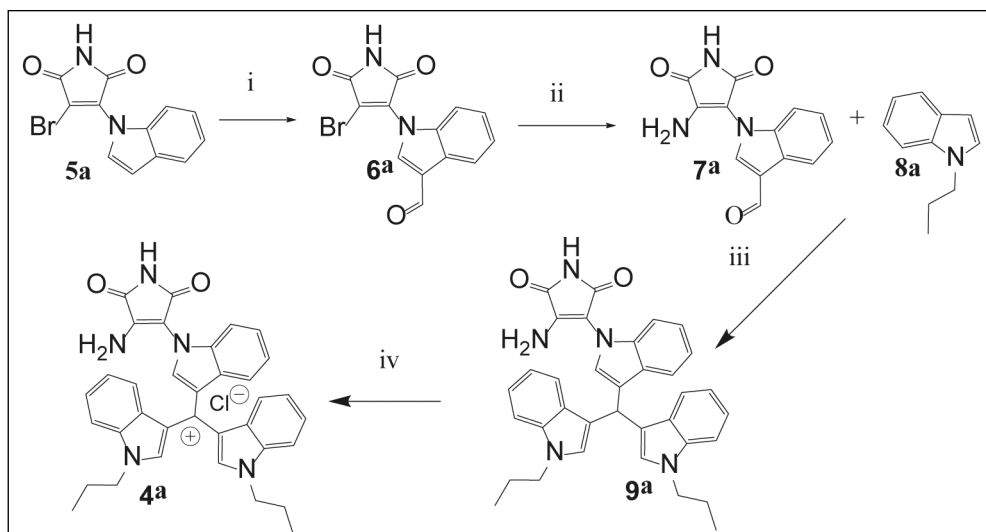


Рис. 2. Схема синтеза 4а.

i – POCl_3 ; DMF, rt, 2h; ii – NH_4OH 25% aq, DMF, rt, 10h; iii – $\text{Dy}(\text{OTf})_3$, MeOH; iv – FeCl_3 , MeOH.

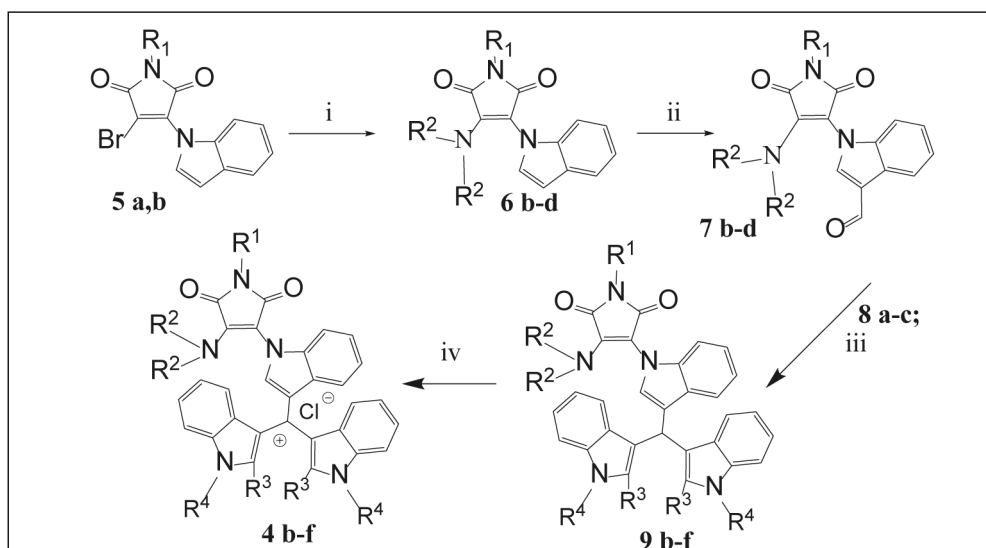


Рис. 3. Схема синтеза соединений 4b–4f и их предшественников.

i – $\text{HN}(\text{R}_2)_2$, DMF, rt, 2h; ii – POCl_3 , DMF, rt, 2h; iii – $\text{Dy}(\text{OTf})_3$, MeOH; iv – FeCl_2 , MeOH.
5: $\text{R}^1 = \text{H}$ (a); CH_3 (b); **6:** $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$ (b); $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$ (c); $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (d); **7:** $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$ (b); $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$ (c); $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (d); **8:** $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$, $\text{R}^3 = \text{H}$ (a); $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$ (b); $\text{R}^4 = n\text{-Bu}$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$ (c); **9:** $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{H}$, $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (b); $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{H}$, $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (c); $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$, $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (d); $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$, $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (e); $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$, $\text{R}^4 = n\text{-Bu}$ (f); **4:** $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{H}$; $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (b); $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{H}$, $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (c); $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$, $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (d); $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$, $\text{R}^4 = n\text{-Pr}$ (e); $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$, $\text{R}^4 = n\text{-Bu}$ (f).

Структурный мотив замещённого малеимида присутствует и во многих других биологически активных веществах как природного происхождения, таких как аркириарубины, полицитрины, стауроспорин, так и в большом количестве синтетических ингибиторов протеинкиназы C [8, 14], в том числе, в высокоактивных производных 3-(индол-1-ил)малеимида типа (3), разработанных на-

ми ранее (см. рис. 1) [15].

В этой работе были разработаны методы синтеза гибридных молекул (4), сочетающих как фрагмент соединений типа 1, так и соединений типа 3 (рис. 1). Основная цель исследования состояла в изучении влияния заместителей на активность соединений в отношении различных тест-микроорганизмов, а также на их токсичность в отношении клеток человека. При этом особое внимание уделялось выявлению взаимосвязи структура–активность у полученных соединений.

Синтез вещества 4а проводили по схеме, показанной на рис. 2, остальные соединения синтезировали по схемам на рис. 3. Методика получения исходных соединений 5а и 5b была описана в нашей предыдущей публикации [16].

Все полученные вещества 4а–f были протестированы на бактериальных и грибных тест-культурах, а также на клетках человека. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2. Для сравнения приведены данные

об активности антибиотиков сравнения — левофлоксацина (Лф) и амфотерицина В (Ам В), а также широко распространённого антибактериального средства — бриллиантового зелёного, имеющего сходный тип строения с одним из фрагментов полученных нами соединений и представляющего собой соль триарилметилия. Также приведены данные об активности одного из ранее получен-

Таблица 1. Антимикробная активность 1b, 4a и 4b

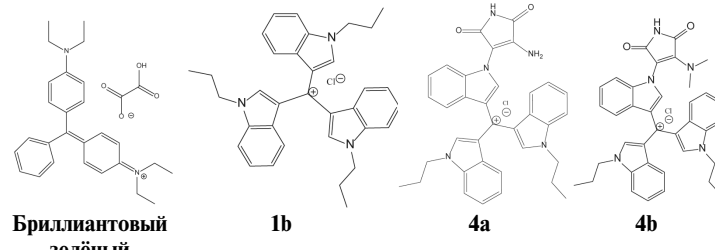
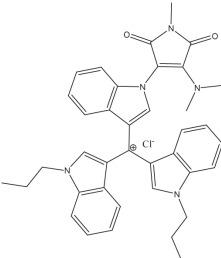
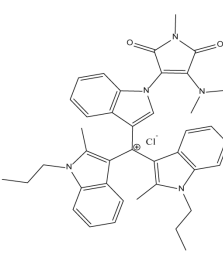
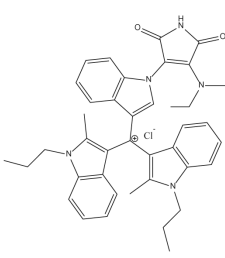
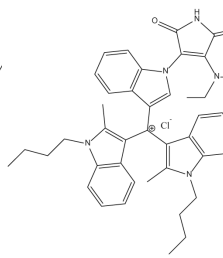
Культуры клеток и микробные штаммы		МПК, мкг/мл			
Контроль*					
Молекулярная масса		474,6	522,1	590,1	618,1
Цитотоксичность, IC ₅₀ , мкг/мл (действие на клетки линий HEK293*/ ПФЧhTERT**)	>50** (ЛФ) 0,72** (Ам В)	0,03**	0,07**	2,77**	0,78*/0,57**
<i>Staphylococcus aureus</i> 3798	32,0 (ЛФ)	0,06	0,13	0,25	0,13
<i>Staphylococcus aureus</i> 100KC	32,0 (ЛФ)	0,06	0,25	0,5	0,13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700699	16,0 (ЛФ)	0,06	0,5	0,5	0,13
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	0,13 (ЛФ)	0,13	0,25	1,0	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> 5	0,25 (ЛФ)	0,06	0,5	0,25	0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,06 (ЛФ)	4,0	>64,0	>64,0	16,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	0,25 (ЛФ)	8,0	>64,0	>64,0	>64,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	1,0 (Ам В)	1	1	12	2
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1,0 (Ам В)	0,25	2	8	2

Таблица 2. Антимикробная активность 4с–4f

Культуры клеток и микробные штаммы	МПК, мкг/мл			
				
Молекулярная масса	632,1	660,2	674,3	702,3
IC ₅₀ , мкг/мл (HEK293*/ ПФЧhTERT**)	0,06*/0,18**	0,15*/0,33**	0.39*	1,23*
<i>Staphylococcus aureus</i> 3798	0,13	0,13	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 100 KC	0,06	0,13	0,5	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700699	0,13	0,13	0,5	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	0,13	0,25	1,0	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 5	0,25	0,5	1,0	1,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16,0	0,5	>64,0	>64,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	—	8	24	96
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	—	48	48	128

ных симметричных производных — трис(1-пропилиндол-3-ил)метилиа (1b) [7].

Анализ взаимосвязи структура—активность показывает, что наличие заместителей у индольного азота R⁴ чрезвычайно важно для проявления антимикробной активности. При R⁴=H вещества 4 практически утрачивали антимикробную активность. Оптимальным является размер заместителя C3—C4 [17]. Заместитель R¹=CH₃ значительно увеличивал ингибирующее воздействие на клеточные линии HEK293*/ ПФЧ hTERT, т. е. приводил к усилению цитотоксичности соединений, одновременно мало воздействуя на их антимикробную активность. Заместители R² увеличивали цитоток-

сичность в отношении клеток HEK293*/ ПФЧ hTERT в ряду H < CH₃ < CH₂CH₃.

Заключение

Благодаря введению фрагмента малеимида, например, в соединении 4a, удалось снизить цитотоксичность практически в 40 раз по сравнению с исходным прототипом — соединением 1b. При этом антибактериальная активность нового препарата осталась примерно на том же уровне. Токсическое действие в отношении клеток человека у соединения 4a оказалось в 92 раза меньше, чем у бриллиантового зелёного и в 4 раза меньше, чем у известного противогрибкового антибиоти-

ка амфотерицина В. Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность разработки гибридных антибиотиков и свидетельствуют о целесообразности проведения работ в выбранном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shallcross L.J., Davies S.C.* The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 11: 2883–2885.
2. *Arias C.A., Murray M.D.* Antibiotic-resistant bugs in the 21st century — a clinical super-challenge. *New England J Med* 2009; 360: 5: 439–443.
3. *MacKenzie F.M., Struelens M.J., Towner K.J., Gould I.M.* Report of the Consensus Conference on Antibiotic Resistance; Prevention and Control (ARPAC). *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 11: 938–954.
4. *Тевяшова А.Н., Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н.* Создание антибиотиков двойного действия как путь поиска новых перспективных лекарственных препаратов. *Успехи химии*. — 2015. — Т. 84. — №1. — С. 61–97. / *Tevyashova A.N., Olsufeva E.N., Preobrazhenskaya M.N.* Sozdanie antibiotikov dvoynogo deystviya kak put' poiska novykh perspektivnykh lekarstvennykh preparatov. *Uspekhi khimii*. 2015; 84: 1: 61–97. [in Russian].
5. *Степанова Е.В., Штиль А.А., Лавренов С.Н. и др.* Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия — новый класс противоопухолевых соединений. *Известия Академии наук. Серия химическая*. — 2010. — Т. 59. — № 12. — С. 2203–2211. / *Stepanova E.V., Shtil' A.A., Lavrenov S.N. i dr.* Soli tris(1-alkilindol-3-il)metiliya — novyy klass protivopukholevykh soedineniy. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2010; 59: 12: 2203–2211. [in Russian]
6. *Тренин А.С., Лавренов С.Н., Мирчик Е.П. и др.* Разработка препаратов на основе трис(1-алкилиндол-3-ил)метана с целью преодоления лекарственной устойчивости возбудителей. *Антибиотики и химиотер* 2017. — Т. 62. — № 1–2. — С. 3–9. / *Trenin A.S., Lavrenov S.N., Mirchik E.P. i dr.* Razrabotka preparatov na osnove tris(1-alkilindol-3-il)metana s tselyu preodoleniya lekarstvennoy ustoychivosti vozbuditel'ey. *Antibiotiki i khimioter* 2017. — Т. 62. — № 1–2. — С. 3–9. [in Russian]
7. *Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E. et al.* Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl)methyl salts: Role of N-alkyl substituents. *Bioorgan Med Chem* 2010; 18: 6905–6913.
8. *Лакатос С.А., Тренин А.С., Симонов А.Ю. и др.* Новые биологически активные соединения в ряду производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида. *Антибиотики и химиотер*. — 2017. — Т. 62. — № 5–6. — С. 3–11. / *Lakatosh S.A., Trenin A.S., Simonov A. YU. i dr.* Novyye biologicheski aktivnye soedineniya v ryadu proizvodnykh 3-(indol-1-il)-, 3-(N-aminoaril)- i 3-(S-tioaril)maleimida. *Antibiotiki i khimioter* 2017; 62: 5–6: 3–11. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лавренов Сергей Николаевич — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Симонов Александр Юрьевич — к. х. н., научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Панов Алексей Александрович — аспирант лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Лакатос Сергей Александрович — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Исакова Елена Борисовна — научный сотрудник лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Цвигун Елена Анатольевна — научный сотрудник лаборатории Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА», Москва

Бычкова Ольга Петровна — к. б. н., Старший научный сотрудник лаборатории Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА», Москва

Благодарности

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10300).

9. Рекомендации Национального Комитета Клинических Лабораторных Стандартов США (NCCLS), 2000. / NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antibacterial Susceptibility Testing, USA, 2000.
10. CLSI M38-A2. Ed. 2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standart. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, 2008.
11. CLSI M27-S3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, 2013.
12. *Кубанова А.А., Степанова Ж.В., Гуськова Т.А. и др.* Методические указания по изучению противогрибковой активности фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К. 2012. — С. 576–584. / *Kubanova A.A., Stepanova ZH.V., Gus'kova T.A. i dr.* Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu protivogribkovoy aktivnosti farmakologicheskikh veshchestv. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. CHast' 1. / Pod red. A.N. Mironova. M.: Grif i K. 2012; 576–584. [in Russian]
13. *Mahboobi S., Eichhorn E., Popp A. et al.* 3-Bromo-4-(1H-3-Indolyl)-2,5-Dihydro-1H-2,5-Pyrroledione Derivatives as New Lead Compounds for Antibacterially Active Substances. *Eur J Medicinal Chem* 2006; 41: 176–191.
14. *Cohen P.* Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 4: 309–315.
15. *Simonov A.Yu., Lakatosh S.A., Luzikov Yu.N., et al.* Synthesis of 4-substituted 3-[3-(dialkylaminomethyl)indol-1-yl]maleimides and study of their ability to inhibit protein kinase c- α , prevent development of multiple drug resistance of tumor cells and cytotoxicity. *Russian Chemical Bulletin* 2008; 57: 9: 2011–2020.
16. *Lakatosh S.A., Luzikov Y.N., Preobrazhenskaya M.N.* Synthesis of 6Hpyrrolo[3',4':2,3][1,4]diazepino[6,7,1-h]indole-8,10(7H,9H)-diones using 3-bromo-4-(indol-1-yl)maleimide scaffold. *Organ Biomolec Chem* 2003; 1: 826–833.
17. *Panov A.A., Lavrenov S.N., Simonov A.Y. et al.* Hybrid antibiotics based on protein kinase inhibitors with some antimicrobial agents: synthesis and biological properties. The Fourth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» Moscow, Russia, 24–28 April 2017, V.1. P.187.

Татарский Виктор Вячеславович — к. б. н., научный сотрудник лаборатории Механизмы гибели опухолевых клеток ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Иванова Екатерина Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории Механизмы гибели опухолевых клеток ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Мирчик Елена Павловна — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА», Москва

Королев Александр Михайлович — д. х. н., Главный научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА», Москва

Тренин Алексей Сергеевич — д. б. н., Заведующий лабораторией Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва

Полиморфизм генов, участвующих в сборке клеточной стенки у метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину

В. В. ГОСТЕВ^{1,2}, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ¹, С. М. ЮДИН³, О. А. ДМИТRENKO⁴,
А. В. КУДРЯВЦЕВА⁵, С. В. СИДОРЕНКО^{1,2}

¹ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург

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

³ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва

⁴ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

⁵ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Cell Wall Biosynthesis Genes Variability in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* with Reduced Vancomycin Susceptibility

V. V. GOSTEV¹, O. S. KALINOGORSKAYA¹, S. M. YUDIN², O. A. DMITRENKO³, A. V. KUDRYAVTSEVA, S. V. SYDORENKO^{1,4}

¹ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg

² North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg

³ Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow

⁴ N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, Moscow

⁵ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow

Проблема формирования и распространения изолятов *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA) ограничивает использование этого антибиотика для терапии инфекций, вызванных MRSA. Процесс формирования такого фенотипа сложный и связан с накоплением мутаций в генах, участвующих в биосинтезе клеточной стенки. В работе было проведено геномное секвенирование семи изолятов, имеющих разную чувствительность к ванкомицину и относящихся к одной генетической линии: ST8 — t008 — SCCmec IVc. Проведённый популяционный анализ для изолятов со сниженной чувствительностью к ванкомицину не выявил hVISA/VISA фенотипов, при этом PAP/AUC составил 0,53—0,7. Сравнение 83% core — частей геномов изолятов с МПК 1 мкг/мл и МПК 2 мкг/мл, а также контрольных геномов (NCBI GenBank) с известной чувствительностью, выявило разную кластеризацию, при этом изоляты с МПК 2 мкг/мл локализовались в одном кластере. Сравнение нуклеотидного конкатената, составленного из 44 генов, участвующих в сборке клеточной стенки, также показало, что изоляты кластеризуются в один кластер. Были выявлены уникальные мутации для изолятов с МПК 2 мкг/мл в *murZ* (T353A), *rpoB* (Y946C) и *fdh2* (G446S). Таким образом, изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину не обладали фенотипом hVISA или VISA. Однако, выявленные мутации в «ключевых» генах биосинтеза пептидогликана могут свидетельствовать о начальном этапе селекции устойчивости к ванкомицину с формированием pre — hVISA.

Ключевые слова: MRSA, ванкомицин, VISA, hVISA, геномное секвенирование, клеточная стенка.

The problem of formation and spread of *S. aureus* isolates with reduced sensitivity to vancomycin (Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA) limits the use of this antibiotic for the treatment of infections caused by MRSA. The formation of such a phenotype is complex and is associated with the accumulation of mutations in the genes involved in the biosynthesis of the cell wall. Genomic sequencing of seven isolates with different sensitivity to vancomycin and belonging to the same genetic line was carried out in the study: ST8 — t008 — SCCmec IVc. PAP analysis of isolates with reduced sensitivity to vancomycin did not reveal hVISA/VISA phenotypes, while PAP/AUC was 0.53—0.7. Comparison of 83% of the core parts of isolates' genomes with MIC = 1 mg/ml and 2 mg/ml, as well as control genomes (NCBI GenBank) with known sensitivity, revealed different clustering, the isolates with MIC=2 mg/ml were localized in one cluster. Comparison of the nucleotide concatenate composed of 44 genes involved in the assembly of the cell wall also showed that the isolates were assembled into one cluster. Unique mutations were identified for isolates with MIC=2 mg/ml in *murZ* (T353A), *rpoB* (Y946C), and *fdh2* (G446S). Thus, isolates with reduced sensitivity to vancomycin did not have the hVISA or VISA phenotype. However, the identified mutations in the «key» genes of peptidoglycan biosynthesis may indicate the initial stage of selection of resistance to vancomycin with the formation of pre-hVISA.

Keywords: MRSA, vancomycin, VISA, hVISA, genomic sequencing, cell wall.

Введение

Ванкомицин — антибиотик, введённый в клиническую практику ещё в конце 1950 гг., остаётся основным препаратом и в настоящее время для

лечения многих форм инфекций, вызванных MRSA (Methicillin — resistant *Staphylococcus aureus*). В 2002 г. был впервые описан ванкомициноустойчивый клинический изолят *S. aureus* (Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA), этот факт послужил тревогой во всем мире, вследствие возможного глобального распространения этого фенотипа [1]. Однако за прошедшие 16 лет в мире

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. Детский научно-клинический центр инфекционных болезней

описано только несколько десятков таких стафилококков. Механизм устойчивости VRSA хорошо изучен и связан с изменением мишени действия ванкомицина благодаря горизонтальному переносу генов *vanAB* в составе мобильных векторов от энтерококков [2]. Основной проблемой является формирование и распространение изолятов *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA). Процесс формирования такого фенотипа сложный и связан с накоплением мутаций в генах, участвующих в биосинтезе клеточной стенки, что фенотипически проявляется в её утолщении, увеличении свободных терминальных концов D-Ala-D-Ala и увеличении МПК ванкомицина от 2–32 мкг/мл [3]. Важно отметить, что изоляты MRSA с МПК 2 мкг/мл (по всем существующим критериям, это значение МПК является пока «чувствительностью») ассоциированы с высоким риском неудовлетворительной антибиотикотерапией [4–5]. В популяции MRSA с МПК 2 мкг/мл могут формироваться субпопуляции клеток с более высокими значениями МПК — 3–4 мкг/мл (Heteroresistant VISA, hVISA). Процесс формирования VISA включает многоступенчатое накопление мутаций, изменение транскриптомного профиля и связан с выраженной гетерогенностью [6]. По результатам работы группы К. Hiramatsu [3], было предложено выделить ещё два фенотипа: это: pre-hVISA, предшественник hVISA и sVISA (slow VISA). Нестабильный фенотип pre — hVISA характеризуется наличием субпопуляции, имеющей некоторые ключевые мутации, легко реверсирует либо в hVISA, либо в чувствительный вариант. sVISA — это фенотип, проявляющий высокий уровень устойчивости (МПК 8 мкг/мл и выше), но с очень низкой скоростью роста [7–8]. Обнаружение hVISA или VISA стандартными микробиологическими методами остаётся весьма проблематичным. По данным многоцентровых исследований, проведённых в России за последние 5 лет, доля изолятов MRSA с МПК ванкомицина 2 мкг/мл составляет 4–30% [9–11]. Остаётся не изученным, сколько среди таких изолятов потенциально могут быть охарактеризованы как pre-hVISA или hVISA фенотипы.

Цель работы — геномное секвенирование представителей доминирующей в России генетической линии MRSA с разной чувствительностью к ванкомицину для оценки полиморфизмов в генах, участвующих в сборке клеточной стенки.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. Семь изолятов были восстановлены из бактериального музея ДНКЦИБ (хранение при -80°C в среде с 30% глицерином) на кровяном агаре с последующей реидентификацией на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany). Чувствительность к ванкомицину оценивали методом серийных разведений с использованием реко-

мендаций EUCAST. Все изоляты, включённые в работу, относились к одному генотипу: сиквенс — тип (ST8), spa — тип t008 и стафилококковая тес — кассета (SCCmec) IVc типа.

Популяционный анализ с ванкомицином (PAP). Популяционный анализ (Population analysis profile, PAP) проводили по методике, описанной в [12]. Для этого из суточных культур, полученных на кровяном агаре, готовили инокулюм с концентрацией клеток $\sim 9 \times 10^8$ КОЕ/мл. Далее делали разведения инокулюма с шагом в один логарифм. Готовили чашки с разной концентрацией ванкомицина 0–16 мкг/мл. Засевали все разведения инокулюма на чашки с антибиотиком. Подсчёт КОЕ проводили через 24 и 48 ч. После этого строили график зависимости количества КОЕ от концентрации антибиотика. Параметр AUC (Area under curve) рассчитывали методом трапеций. Для предсказания фенотипа hetero — VISA или VISA рассчитывали соотношение PAP/AUC относительно референсного штамма Mu50 по формуле: AUC (тестируемый штамм) / AUC (референсный штамм). Интерпретацию результатов осуществляли исходя из следующих критериев: при получении PAP/AUC < 0,9 — оценивали как VSSA фенотип, PAP/AUC > 0,9 — hVISA/VISA.

Полногеномное секвенирование. Для выделения геномной ДНК проводили предварительный лизис клеток в присутствии 5 мг/мл лизоафалина (Sigma Aldrich, USA) и 100 мг/мл лизоцима (Amresco, USA) в трис — ЭДТА буфере в течение 60 мин при 37°C. Далее выделение и очистку ДНК проводили с использованием набора Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) по протоколу производителя. Полногеномное секвенирование изолятов SA0274 и SA0422 проводили на платформе Miseq (Illumina, USA). Использовали пул библиотек ДНК, приготовленных с помощью набора Nextera XT с последующим получением парноконцевых ридов размером 2×300 п. н. (ver. 3 Illumina kit). Все этапы секвенирования проводили в соответствии с протоколами производителя. Полногеномное секвенирование изолятов SA0077, SA0518 — SA0521 проводили на приборе «GS Junior» («Roche», Швейцария) с приготовлением Shotgun библиотек со стандартными наборами «GS Junior Titanium Kit» («Roche»). Среднее покрытие геномов составило $\times 30$ – $\times 70$.

Анализ результатов (биоинформационный анализ). Сборку геномов осуществляли с помощью SPAdes 3.5.0 [13] после предварительного анализа и редакции ридов в программах FastQC и Trimmomatic [14]. Геномное выравнивание и определение SNP (Single Nucleotide Polymorphism) проводили с использованием Parsnp — harvest [15]. Подготовка нуклеотидных конкатенатов (concatenate nucleotide sequences), а также проведение выравнивания и построение филогенетических деревьев проводили на платформе Unipro Ugene [16]. Полученные сиквенсы доступны в NCBI GenBank, изоляты SA0518 — SA0521: JFAY, JFAR, JHBP, JFAU, изоляты SA0077, SA0274 и SA0422 доступны в BioProject: PRJNA325350.

Результаты и обсуждения

Из семи изолятов, включённых в исследование, три изолята (SA0077, SA0274 и SA0422) имели МПК ванкомицина 2 мкг/мл. Для детекции hVISA, VISA фенотипов был проведён PAP для этих изолятов, кривые зависимостей роста от различной концентрации антибиотика представлены на рис. 1. Исходя из полученных результатов видно, что изоляты с МПК 2 мкг/мл не обладают hVISA или VISA-фенотипами, и соотношение PAP/AUC не превышало 0,7 (таблица). При этом контрольный штамм ATCC29213 с МПК 1 мкг/мл имел PAP/AUC = 0,63. Стоит отметить, что в работе [17] было отмечено, что наибольшей долей MRSA со сниженной чувствительностью к

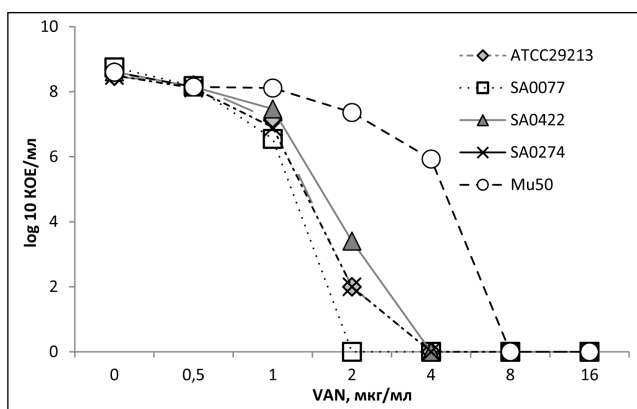


Рис. 1. РАР — анализ для изолятов, имеющих МПК ванкомицина 2 мкг/мл.

ванкомицину характеризуется клональный комплекс 8 (СС8), к числу которых, относятся и изучаемые в настоящей работе изоляты.

С целью выявления возможных механизмов, обуславливающих сниженную чувствительность к ванкомицину, было проведено геномное секвенирование. Для этого в качестве сравнительной группы были отобраны изоляты с МПК ванкомицина 1 мкг/мл. В анализ были добавлены сиквенсы референсных изолятов с хорошо описанными фенотипическими и генотипическими особенностями — это VISA и hVISA штаммы (Mu50, Mu3, JKD6008, Z172, JH9), имеющие МПК 4–8 мкг/мл. Были включены также изоляты N315 и 16K (МПК < 2 мкг/мл). В качестве референсного штамма для сравнения всех сиквенсов был выбран штамм COL. Выбор этого штамма как референсного продиктован тем, что он был выделен ещё в 1960 годах, до периода массового применения ванкомицина в клинической практике, и таким образом возможные генетические изменения

у этого штамма под влиянием ванкомицина сведены к минимуму.

Исходя из опубликованных данных, а также анализируя биосинтетический путь сборки клеточной стенки *S. aureus*, при использовании базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), были отобраны 44 гена, ассоциированные со снижением чувствительности к ванкомицину. Перечень генов включал: функциональные гены: *ddl*, *murA*, *murB*, *murZ*, *murC*, *murD*, *murE*, *murF*, *murI*, *murG*, *pbp2*, *mecA*, *pbp4*, *mprF*, *mraY*, *femAB*, *femX*, *FtsI12*, *msrR*, *sgtA*; регуляторные гены: *yvqF*, *vraSR*, *vraFG*, *vraT*, *walKR*, *graSR*, *sigB*, *rpoBC*, *sle1*, *stp1*; гены общего метаболизма: *clpP*, *gluA*, *mgt*, *cmk*, *fdh2*, *glmU*, SACOL2161. Перечисленные гены для каждого анализируемого изолята, включая контрольные, были объединены в единый конкатенат размером 59478 тыс. п.н. (около 1,5% от стафилококкового генома). Далее последовательности были выровнены с последующим кластерным анализом. Результаты геномного выравнивания и выравнивания конкатената представлены на рис. 2. Так, при геномном сравнении изучаемые изоляты были сгруппированы в несколько кластеров — А, В, С и D, при этом максимально удалёнными оказались изоляты SA0518, SA0519, SA0521. Core — часть всех сравниваемых геномов — составила 83%. Группа изолятов с МПК 2 мкг/мл была сформирована одним кластером (А), однако также здесь локализовался изолят SA0520 с МПК 1 мкг/мл. Изоляты кластера А отличались между собой на 71–132 SNP, и имели 170–213 SNP по сравнению с изолятом SA0520 (кластер В). Максимальное эволюционное расстояние наблюдалось при сравнении с изолятами кластеров D и С, соответственно количество SNP составляло 147–202 и 140–200. При анализе конкатената, топология кластеров

Сравнительная характеристика изолятов MRSA генетической линии ST8-t008-SCCmec IVc с разной чувствительностью к ванкомицину

Изоляты	Год	МПК VAN, мкг/мл	AUC/PAP**	Миссенс-мутации в генах БПГ*									
				<i>murA</i>	<i>murZ</i>	<i>murB</i>	<i>murF</i>	<i>mecA</i>	<i>sgtA</i>	<i>femX</i>	<i>rpoB</i>	<i>vraS</i>	<i>fdh2</i>
SA0077	2011	2	0,56	G257D	T353A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S Y946C	V91I	—
SA0422	2011	2	0,7	G257D	T353A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S Y946C	V91I	—
SA0274	2012	2	0,63	G257D	T353A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S Y946C	V91I	G446S
SA0518	1998	1	—	G257D	—	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A M220W L875S	—	—
SA0519	2005	1	—	G257D	V258A	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	—	V91I	—
SA0520	1998	1	—	G257D	—	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S	V91I	—
SA0521	1998	1	—	G257D	—	L115R	T301I	E246G	K200R	T102A	V798A L875S	V91I	—

Примечание. * — БПГ — биосинтез пептидогликана; ** — AUC/PAP был сделан только для изолятов с МПК ванкомицина 2 мкг/мл.

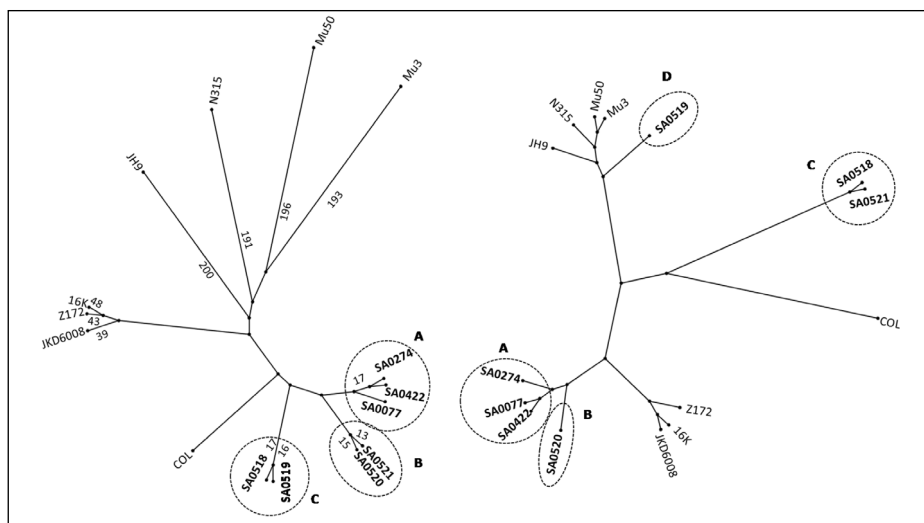


Рис. 2. Результаты выравнивания конкатената, включающего нуклеотидные последовательности 44 генов (слева) и полных геномов (справа), вид — радиальное дерево, кладограмма (пропорциональный масштаб).

Для построения дерева конкатената был использован алгоритм максимального правдоподобия PHuML. Жирным шрифтом выделены Российские изоляты; пунктиром отмечены отдельные кластеры для двух выравниваний. Для конкатената над ветвями указаны количества SNP по сравнению с референсным геномом COL.

на дереве немного менялась. В целом, вся группа анализируемых Российских изолятов была локализована достаточно близко относительно друг друга, но, тем не менее, кластер А оставался в таком же составе. Изоляты с МПК 1 мкг/мл группировались в кластеры В (SA0520, SA0521) и С (SA0518, SA0519).

При детальной оценке распределения мутаций было выявлено, в которых выявлялись миссенс-мутации, в частности *murA*, *murZ*, *murB*, *murF*, *mecA*, *sgtA*, *femX*, *rpoB*, *vraS*, *fdh2* (см. табл. 1). Уникальные мутации, характерные только для изолятов с МПК 2 мкг/мл были обнаружены в нескольких генах — *murZ* (T353A), *rpoB* (Y946C) и *fdh2* (G446S). Ген *murZ* кодирует UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase, фермент участвующий на ранней стадии сборки пептидогликана. В недавних экспериментах было установлено, что фенотипы sVISA, полученные при селекции *in vitro* характеризовались наличием мутаций в этом гене в позициях G10V, T240R, T306I, авторы рассматривают эти мутации как компенсаторные при формировании высокой степени устойчивости у sVISA фенотипов [18]. Мутация в позиции T353A, обнаруженная у Российских изолятов, ранее не описывалась, и возможно является одним из факторов снижения чувствительности к ванкомицину. Также у изолята SA0519 выявлена замена в позиции V258A. Ген *rpoB*, кодирующий β -субъединицу РНК-полимеразы, является глобальным регулятором и важнейшим переключателем фенотипов VSSA → hVISA → VISA. Описано около 50 вариантов мутаций в *rpoB* у

клинических изолятов, проявляющих сниженную чувствительность к ванкомицину, роль многих из них доказана в экспериментах по мутагенезу [6, 19]. Почти у всех изолятов были обнаружены миссенс-мутации в *rpoB* в позициях V798A и L875S. Отмечается, что такие мутации могут опосредовать формирование гоморезистентности к бета-лактамам, в частности к оксациллину. Высокий уровень гоморезистентности к оксациллину является триггерным механизмом для формирования снижения чувствительности к ванкомицину [3, 20]. Другая мутация Y946C была характерна только для изолятов с МПК 2 мкг/мл.

Ранее такой вариант замены не был описан, однако данная позиция находится в локусе, где обнаруживаются мутации характерные для sVISA (H929T G977V) и VISA (L887F, Q1069E, A1085V) [3, 6]. У изолята SA0274 была обнаружена мутация (G446S) в гене *fdh2*, предположительно кодирующий формилдегидрагеназу. Мутации в этом гене опосредуют утолщение клеточной стенки и обнаруживаются среди VISA изолятов [6, 21].

Проведённое исследование имеет ряд ограничений: во-первых, в работу были включены изоляты только одной генетической линии, во-вторых количество анализируемых геномов не достаточно для того, что бы сделать выводы о популяционном накоплении изменений в генах биосинтеза пептидогликана, потенциально опосредующих феномен «MIC creep» (феномен сползания МПК), и в-третьих, не была проведена оценка полиморфизмов анализируемых генов в глобальной популяции *S. aureus*. Для подтверждения роли обнаруженных мутаций необходимо дополнительное проведение опытов по сайт-направленному мутагенезу.

Таким образом, проведённый анализ показал, что изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину (МПК 2 мкг/мл) не обладают фенотипом hVISA или VISA. Однако выявленные мутации в «ключевых» генах биосинтеза пептидогликана (*murZ*, *rpoB* и *fdh2*) могут свидетельствовать о начальном этапе селекции устойчивости к ванкомицину с формированием pre-hVISA. Также возможным вариантом является формирование одной генетической линии со

сниженной чувствительностью к ванкомицину, которая имеет большее распространение по сравнению с другими генетическими линиями в Российской Федерации. Ранее нами отмечалось, что среди ST8 — t008-SCCmec IVc, доля изолятов с МПК 2 мкг/мл выше по сравнению с другими генетическими линиями [22]. Не смотря на большое количество альтернатив для лечения MRSA-инфекций, в нашей стране ванкомицин остаётся препаратом выбора, а также используется в эмпирической терапии. Полученные данные могут

ЛИТЕРАТУРА

- Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vana* resistance gene. *N Engl J Med* 2003; 348 (14): 1342–1347.
- Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42: Suppl 1: S25–34.
- Hiramatsu K., Kayayama Y., Matsuo M., Aiba Y., Saito M., Hishinuma T., Iwamoto A. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* 2014; 2 (4): 213–224.
- Casapao A.M., Davis S.L., McRoberts J.P., Lagnf A.M., Patel S., Kullar R., Levine D.P., Rybak M.J. Evaluation of vancomycin population susceptibility analysis profile as a predictor of outcomes for patients with infective endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (8): 4636–4641.
- van Hal S.J., Lodise T.P., Paterson D.L. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; 54 (6): 755–771.
- Hu Q., Peng H., Rao X. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2016; 7: 1601.
- Katayama Y., Azechi T., Miyazaki M., Takata T., Sekine M., Matsui H., Hanaki H., Yahara K., Sasano H., Asakura K. et al. Prevalence of Slow-Growth Vancomycin Nonsusceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61 (11).
- Saito M., Katayama Y., Hishinuma T., Iwamoto A., Aiba Y., Kuwahara-Arai K., Cui L., Matsuo M., Aritaka N., Hiramatsu K. «Slow VISA», a novel phenotype of vancomycin resistance, found *in vitro* in heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (9): 5024–5035.
- Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Попов Д.А., Астанина М.А., Жданова О.А. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования Марафон в 2011–2012 гг. КМАХ. — 2014. — Т. 16. — № 4. — С. 280–286. / Sukhorukova M.V., Skleenova E.YU., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Eydel'shteyn M.V., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., Popov D.A., Astanina M.A., Zhdanova O.A. et al. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtamov *Staphylococcus aureus* v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogotsentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya Marafon v 2011–2012 gg. KMAKH. — 2014. — Т. 16. — № 4. — С. 280–286. [in Russian]
- Гостев В.В., Калиногорская О.С., Попенко Л.Н., Черненко Т.В., Науменко З.С., Ворошилова Т.М., Захарова Ю.А., Хослова О.Е., Круглов А.Н., Ершова М.Г., Молчанова И.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации. Антибиотики и химиотер. — 2015. — 60. — № 1–2. — С. 3–9 / Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Popenko L.N., Chernenkaya T.V., Naumenko Z.S., Voroshilova T.M., Zakharova Y.A., Khokhlova O.E., Kruglov A.N., Ershova M.G., Molchanova I.V., Sidorenko I.V. et al. Antibiotic Resistance of MRSA in the Russian Federation. *Antibiot i Khimioter* 2015; 60 (1–2): 3–9. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; ассистент кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учрежде-

свидетельствовать о начальном этапе селекции устойчивости к ванкомицину. В этой связи, неадекватное и продолжительное использование гликопептидов будет способствовать росту «MIC creep» и увеличению неблагоприятных исходов терапии ванкомицином.

Уведомление: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00185).

- Романов А.В., Дехнич А.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Попов Д.А. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования Марафон в 2013–2014 гг. КМАХ. — 2017. — Т. 19. — № 1. — С. 57–62. / Romanov A.V., Dekhnic A.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Eydel'shteyn M.V., Kozlov R.S., Popov D.A. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nykh shtamov *Staphylococcus aureus* v stacionarakh Rossii: rezul'taty mnogotsentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya Marafon v 2013–2014 gg. KMAKH 2017; 19 (1): 57–62. [in Russian]
- Wootton M., Howe R.A., Hillman R., Walsh T.R., Bennett P.M., MacGowan A.P. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47 (4): 399–403.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012; 19 (5): 455–477.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30 (15): 2114–2120.
- Treangen T.J., Ondov B.D., Koren S., Phillippy A.M. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 2014; 15 (11): 524.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012; 28 (8): 1166–1167.
- Holmes N.E., Turnidge J.D., Munckhof W.J., Robinson J.O., Korman T.M., O'Sullivan M.V., Anderson T.L., Roberts S.A., Warren S.J., Coombs G.W. et al. Genetic and molecular predictors of high vancomycin MIC in *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (9): 3384–3393.
- Matsuo M., Hishinuma T., Katayama Y., Hiramatsu K. A mutation of RNA polymerase beta' subunit (RpoC) converts heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) into «slow VISA». *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59 (7): 4215–4225.
- Katayama Y., Sekine M., Hishinuma T., Aiba Y., Hiramatsu K. Complete Reconstitution of the Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Phenotype of Strain Mu50 in Vancomycin-Susceptible *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60 (6): 3730–3742.
- Aiba Y., Katayama Y., Hishinuma T., Murakami-Kuroda H., Cui L., Hiramatsu K. Mutation of RNA polymerase beta-subunit gene promotes heterogeneous-to-homogeneous conversion of beta-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (10): 4861–4871.
- Matsuo M., Cui L., Kim J., Hiramatsu K. Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (12): 5843–5853.
- Gostev V., Kruglov A., Kalinogorskaya O., Dmitrenko O., Khokhlova O., Yamamoto T., Lobzin Y., Ryabchenko I., Sidorenko S. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Infect Genet Evol* 2017; 53: 189–194.

ния высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Юдин Сергей Михайлович — д. м. н., профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва

Дмитренко Ольга Александровна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ патогенности (с группой стафилококковых инфекций) отдела бактериальных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи», Москва

Кудрявцева Анна Викторовна — к. м. н., ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН (ИМБ РАН), Москва

Сидоренко Сергей Владимирович — профессор, д. м. н., ведущий научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; профессор кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Влияние донора оксида азота на противоопухолевую активность доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы крыс

*А. И. АЛЕКСЕЕВА^{1,2}, А. С. ХАЛАНСКИЙ¹, В. В. ФЕДОСЕЕВА¹, П. Л. ГОРЕЛИКОВ¹, С. Э. ГЕЛПЕРИНА³

¹ НИИ морфологии человека, Москва

² Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

³ ООО «Технология лекарств», Москва

Potentiating Effect of Nitric Oxide Donor on Antitumor Activity of Doxorubicin in Glioblastoma-Bearing Rats

A. I. ALEKSEEVA^{1,2}, A. S. KHALANSKY¹, V. V. FEDOSEEVA¹, P. L. GORELIKOV¹, S. E. GELPERINA³

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

³ LLC «Drugs Technology», Moscow

Цель исследования — оценка противоопухолевого эффекта комбинации доксорубина (Докс) и донора NO нитроглицерина (НГ) в отношении глиобластомы 101.8 у крыс. **Материалы и методы.** Глиобластоме 101.8 имплантировали интракраниально самцам крыс Wistar. Животных рандомизировали по группам и вводили следующие препараты ($n=15-19$): 1) доксорубин (Докс, 1,5 мг/кг, в/в), 2) нитроглицерин (НГ, масляный раствор, 5 мг/кг, наружно), 3) доксорубин (Докс+НГ, 1,5 мг/кг, в/в) + нитроглицерин (5 мг/кг, наружно). Лечение проводили на 2-й, 5-й и 8-й дни после имплантации опухоли. Животных наблюдали в течение 100 дней. Размер опухоли определяли гистологическим методом на 14-й день ($n=6-9$). В качестве контроля использовали нелеченных животных. **Результаты.** Результаты лечения оценивали по увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %) и торможению роста опухоли (ТРО, %). Увеличение продолжительности жизни было отмечено во всех группах. Максимальный эффект был достигнут в группе Докс+НГ: УПЖ — 176%, ТРО — 89%. В группе Докс УПЖ составило 130%, ТРО — 75%. УПЖ при терапии нитроглицерином составило 130%. **Вывод.** На модели экспериментальной глиобластомы 101.8 у крыс показано повышение противоопухолевого эффекта доксорубина при сочетанном применении с донором оксида азота нитроглицерином. Этот феномен, вероятно, обусловлен более эффективным проникновением доксорубина в опухоль в результате воздействия монооксида азота на церебральные сосуды.

Ключевые слова: нитроглицерин, доксорубин, глиобlastoma 101.8.

The objective of the study was to investigate the influence of the NO donor nitroglycerin (NG) on the antitumor effect of doxorubicin (Dox) in rats with the intracranially implanted 101.8 glioblastoma. **Materials and methods.** Male Wistar rats with the implanted 101.8 glioblastoma were treated with the following formulations ($n=15-19$): doxorubicin (Dox, 1.5 mg/kg, i.v.), nitroglycerin (NG, 5 mg/kg, oil solution, topical), and a combination of doxorubicin and nitroglycerin (Dox+NG: 1.5 mg/kg and 5 mg/kg, respectively) on 2nd, 5th, and 8th day after tumor implantation. The tumor size was measured on the histological sections of the brain on the 14th day ($n=6-9$). The remaining animals were followed up for survival for 100 days. Untreated animals were used as control ($n=22$). **Results.** The antitumor effect was evaluated by the increase in life expectancy (ILE, %) and tumor growth inhibition (TGI, %) relative to untreated animals in control group. The increased life expectancy was observed in all groups. The maximal effect was achieved in the Dox+NG group: ILE 176%, TGI 89%. In the Dox group, the ILE was 130% and TGI was 75%. Nitroglycerin alone produced the ILE of 130%. **Conclusion.** Nitric oxide donor nitroglycerin considerably potentiated the antitumor activity of doxorubicin against the intracranial glioblastoma in rats. This phenomenon is most probably explained by the increased penetration of doxorubicin into the tumor due to the enhanced permeability of the cerebral endothelium produced by NO generated by nitroglycerin.

Keywords: nitroglycerin, doxorubicin, glioblastoma 101.8.

Введение

Мультиформная глиобlastoma является наиболее распространённой и агрессивной первичной опухолью головного мозга. Несмотря на значительный прогресс в области диагностики и ле-

чения, продолжительность жизни пациентов с глиобlastомой после лечения остается низкой и редко превышает один год. Результативность хирургического лечения глиобlastомы невелика ввиду инфильтративного роста опухоли, а химиотерапия недостаточно эффективна из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), препятствующего проникновению в мозг многих противоопухолевых препаратов [1]. В частности,

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: mariott@bk.ru

в мозг весьма ограниченно проникают субстраты АТФ-зависимых трансмембранных транспортеров белков множественной лекарственной устойчивости, которые экспрессированы в апикальных мембранах эндотелиоцитов церебральных капилляров, формирующих ГЭБ [2]. Так, внутривенно введенный доксорубин, субстрат Р-гликопротеина (Р-рр) одного из основных транспортеров, не эффективен при глиобластоме, так как, несмотря на повышенную проницаемость ГЭБ в опухоли, его концентрации в мозге при этом способе введения не достигают терапевтического уровня [3]. В то же время при интраопухолевом (интракраниальном) введении доксорубина существенно продлевал жизни пациентов с глиобластомой [4]. Таким образом, разработка неинвазивного метода, который позволил бы повысить эффективность доставки доксорубина через ГЭБ и реализовать потенциал этого препарата для химиотерапии опухолей мозга, является весьма актуальной.

Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что проницаемость церебрального эндотелия может возрасть под воздействием монооксида азота (NO) [5, 6]. Механизм этого феномена до конца не изучен. Считают, что повышение концентрации NO приводит к возрастанию концентраций циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) [7] и/или образованию пероксинитрита [8], которые, в свою очередь, влияют на белки, участвующие в образовании плотных контактов эндотелиальных клеток, и ослабляют эти контакты. Кроме того, NO ингибирует функцию Р-рр путём изменения его конформации [9] или снижения гликолиза в эндотелиальных клетках, что приводит к расщеплению АТФ [10]. Таким образом, доноры NO способствуют повышению транспорта в мозг субстратов Р-рр [11]. Другим важным аспектом влияния NO на функцию этого транспортера является снижение Р-рр-зависимой резистентности опухолевых клеток при повышении концентраций NO. Так, показано, что воздействие доноров NO на резистентные к доксорубину клетки карциномы кишечника HT29-dх приводило к значительному повышению внутриклеточных концентраций доксорубина и восстановлению чувствительности клеток [9]. В то же время возможность использования доноров NO для повышения ограниченного Р-гликопротеином транспорта доксорубина через ГЭБ и его эффективности в отношении опухолей мозга остаётся неизученной.

Соответственно, целью настоящего исследования являлось изучение влияния донора NO нитроглицерина на противоопухолевый эффект доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы 101.8 у крыс.

Материал и методы

Эксперимент выполнен на 72 самцах крыс Вистар массой тела 200–250 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН Научного центра биомедицинских технологий ФМБА. Условия содержания животных и выполнения манипуляций соответствовали «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 № 267) и закону «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г.

В качестве экспериментальной модели использовали глиобласту 101.8 крыс из коллекции опухолей ФГБУН «НИИ морфологии человека». По данным морфологического исследования опухоль имеет устойчивое строение глиобластомы [12]. Трансплантацию глиобластомы 101.8 осуществляли интракраниально под наркозом (Золетил, 50 мг/кг). С помощью зубоорачебного бора диаметром 2 мм в правой теменной кости черепа делали отверстие на расстоянии 2 мм от сагиттального шва и 2 мм каудально от венечного шва. Свежую измельчённую опухолевую ткань (0,8–1 млн клеток) вводили в отверстие на глубину 4 мм от наружной поверхности кости в область полосатого тела с помощью троакара диаметром 1,8 мм. Животных с имплантированной опухолью рандомизировали по группам ($n=15–19$), которые получали следующее лечение на 2-е, 5-е и 8-е сутки после имплантации опухоли:

- 1) доксорубин (Докс), субстанция доксорубина, внутривенно, $3 \times 1,5$ мг/кг;
- 2) нитроглицерин (НГ), наружно, 3×5 мг/кг;
- 3) комбинация Докс+НГ в тех же дозах.

В качестве контроля использовали группу, не получавшую лечения ($n=22$). Субстанцию доксорубина (Sicor S.p.A, Италия) вводили в виде водного раствора. Масляный раствор нитроглицерина (Nitrolingual forte®, Pohl Boscamp) наносили на освобождённую от шерсти кожу спины площадью 2×2 см. В группе Докс+НГ нитроглицерин наносили на кожу непосредственно после введения доксорубина. Срок наблюдения составлял 100 дней. Выживших животных подвергали эвтаназии; мозг этих животных исследовали, как описано ниже.

Противоопухолевый эффект оценивали по показателям продолжительности жизни — медиане, увеличению продолжительности жизни относительно контроля (УПЖ, %) и критерием выживаемости Каплана-Мейера, а также по индексу торможения роста опухоли (ТРО, %).

Для морфометрической оценки опухоли на 14-е сутки после имплантации часть животных из каждой группы ($n=6–9$) подвергали эвтаназии передозировкой диэтилового эфира. Головной мозг фиксировали в 10% забуференном формалине не менее 48 ч, затем заливали в парафин. Серийные гистологические срезы (толщина 5 мкм, шаг 125 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином. Для морфометрии отбирали срезы с максимальной площадью поперечного сечения. Измерение площади срезов проводили с помощью морфометрической программы Image-Pro 6.0.

Для статистического анализа применяли программу Statistica 8 (Statsoft). Статистическую обработку данных проводили непараметрическим методом с использованием критерия множественного сравнения Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Как отмечено выше, целью данного исследования являлась оценка сочетанного действия нитроглицерина и доксорубина на экспериментальную глиобласту 101.8 у крыс. Режим введения и доза доксорубина, использованные в настоящем исследовании, были выбраны на основании ранее

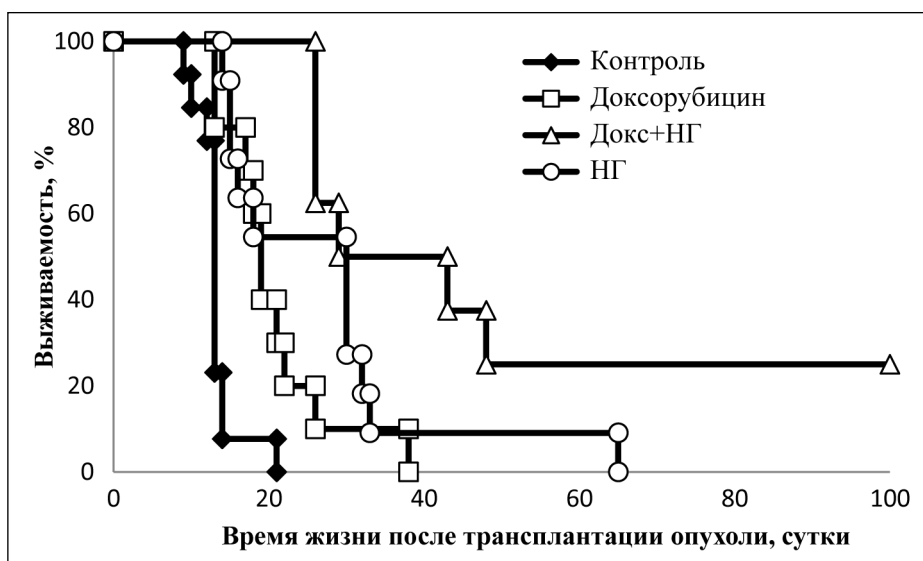


Рис. 1. Выживаемость крыс с глиобластомой 101.8 после химиотерапии с использованием доксорубицина, нитроглицерина или их комбинации ($n=15-19$).

проведённых экспериментов по химиотерапии глиобластомы 101.8 [13]. При выборе пути введения (трансдермального) и дозы нитроглицерина руководствовались данными о фармакокинетике этого препарата [14]. В отличие от внутривенного введения, для которого характерна быстрая элиминация нитроглицерина из крови, при трансдермальном пути введения пиковые концентрации поддерживаются в течение 4–6 ч, что обеспечивает также продолжительное воздействие на сосуды и может способствовать проникновению препарата в опухоль.

Данные по продолжительности жизни животных приведены на рис. 1 и в табл. 1, 2. Медиана продолжительности жизни (Me) в контрольной группе составила 13 дней. Во всех экспериментальных группах наблюдалось увеличение продолжительности жизни животных по отношению к контролю. После лечения доксорубицином УПЖ составило 46%, однако по сравнению с нелечеными животными различия были недостоверны. Интересно, что нитроглицерин значительно повысил время жизни животных: показатель УПЖ составил 130%, что

значительно выше, чем в группе Докс. Наибольшее значение УПЖ 176% отмечено в группе, получавшей доксорубицин в сочетании с нитроглицерином. Два из восьми животных в этой группе выжили в течение 100 дней; при вскрытии опухоли в головном мозге у них обнаружено не было. В группах, леченных доксорубицином (Докс) или нитроглицерином (НГ) выживших животных не было (см. рис. 1). Данные морфометрической оценки опухоли на фронтальных срезах головного мозга на 14-й день после трансплантации (6-й день после окончания лечения) приведены в табл. 1 и 2. Опухоль была обнаружена у всех животных в контрольной группе (медиана максимальной площади опухоли составила 23,05 мм²). В группах животных, леченных доксорубицином в сочетании с нитроглицерином и без него, показатели ТРО составили 89% и 75%, соответственно. В группе, получавшей только доксорубицин (Докс, $n=6$), у одного животного опухоль отсутствовала. Следует отметить, что хотя применение нитроглицерина и привело к повышению продолжительности жизни животных, его влияние на размер опухолей было незначительным: ТРО составило всего 16%, при этом статистические различия были недостоверными (табл. 1, 2).

Обсуждение результатов

Как показывают экспериментальные данные, противоопухолевый эффект в отношении интракраниально имплантированной глиобластомы 101.8 был отмечен во всех группах, в том числе в группе, получавшей доксорубицин, что коррелирует с полученными ранее данными [13]. Как от-

Таблица 1. Параметры выживаемости и размеры опухоли после химиотерапии глиобластомы 101.8 с использованием доксорубицина, нитроглицерина или их комбинации ($n=15-19$)

Группы	Выживаемость			Площадь опухоли		
	Me (25%; 75%), сут	М	УПЖ, %	Me (25%; 75%), мм ²	М	ТРО, %
Контроль	13 (13; 13)	13	—	23,05 (20,5; 25,6)	21,8	—
Докс	19 (17; 22)	21	46	5,75 (0,32; 7,7)	5,4	75
Докс+НГ	36 (26; 61)	50	176	2,6 (0,65; 3,8)	3,3	89
НГ	30 (16; 31)	33	130	19,32 (8,45; 28,04)	17,9	16

Таблица 2. Статистические различия между экспериментальными группами (критерий Краскелла–Уоллиса)

Группы	Выживаемость				Площадь опухоли			
	Контроль	Докс	Докс+НГ	НГ	Контроль	Докс	Докс+НГ	НГ
Контроль	—	0,076914	0,000018	0,001964	—	0,048843	0,010595	1,000000
Докс	—	—	0,158934	1,000000	—	—	1,000000	0,664248
Докс+НГ	—	—	—	1,000000	—	—	—	0,263727
НГ	—	—	—	—	—	—	—	—

мечалось выше, доксорубицин практически не проникает через неповреждённый ГЭБ. Однако известно, что активный неоангиогенез в глиомах приводит к локальному повышению проницаемости ГЭБ; при этом на границах опухоли ГЭБ сохраняет свои функции [15]. Таким образом, доксорубицин, по-видимому, проникает в опухоль (что и объясняет его противоопухолевый эффект), однако для глиобластомы 101.8 характерен выраженный инфильтративный рост (рис. 2), и концентрации доксорубицина в зонах роста, очевидно, оказываются недостаточными для длительного торможения опухолевого процесса.

В группе животных, получавших только нитроглицерин, достоверно увеличилась продолжительность жизни (на 130%). Известно, что нитроглицерин оказывает прямое антиангиогенное и проапоптотическое действие на опухолевые клетки, связанное со снижением уровня гипоксии в опухолевых тканях, активацией каспаз и ингибированием эндогенных ингибиторов апоптоза [16], однако в данном исследовании торможение роста опухоли под воздействием нитроглицерина, определённое на 14-й день, было незначительным (см. табл. 1). Таким образом, увеличение продолжительности жизни в группе НГ связано скорее с вазодилатирующим действием нитроглицерина. По мере роста глиобластомы у животных развивается отёк головного мозга, происходят множественные кровоизлияния, что часто является непосредственной причиной их гибели. Действие нитроглицерина на мозговое кровообращение неоднозначно, однако он может расширять сосуды и улучшать микроциркуляцию в сосудах мозга [17, 18], что, в свою очередь, может снижать частоту кровоизлияний.

Наибольший противоопухолевый эффект по всем показателям был отмечен в группе Докс+НГ: продолжительность жизни животных с опухолью в этой группе увеличилась на 176%, а площадь опухоли на срезах головного мозга

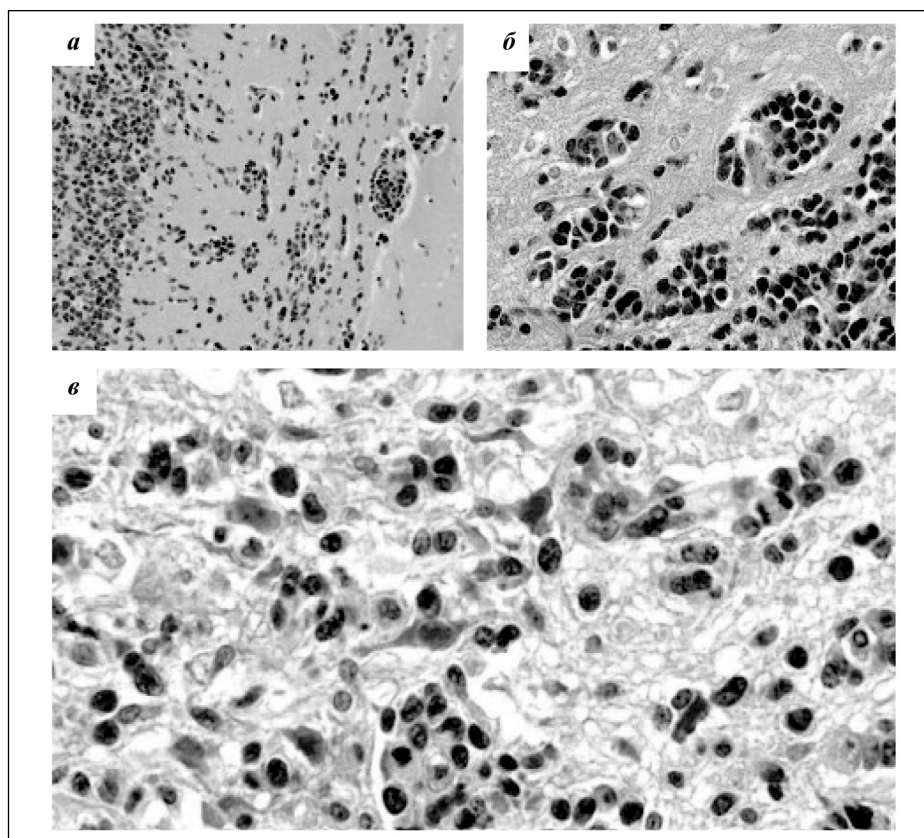


Рис. 2. Морфологическая характеристика инфильтративного роста глиобластомы 101.8.

а, б — граница опухоли и неопухолевой нервной ткани головного мозга при глиоме 101.8. Инфильтративный рост опухоли. Скопления атипических клеток в пограничной зоне с образованием железистоподобных структур. *в* — периваскулярное и перинеурональное скопление атипических клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: *а* — $\times 200$; *б, в* — $\times 400$.

уменьшилась на 89% по отношению к нелеченым животным. Таким образом, нитроглицерин повысил эффективность доксорубицина при совместном введении. Подобный потенцирующий эффект нитроглицерина и других доноров оксида азота в отношении цитостатиков был отмечен и для других препаратов, в том числе для карбоплатина при химиотерапии экспериментальной глиомы С6 у крыс [19]. Можно полагать, что этот феномен обусловлен, с одной стороны, лучшим проникновением доксорубицина в опухоль в результате вазодилатирующего действия нитроглицерина на сосуды и ингибирования Р-гр церебрального эндотелия, а с другой стороны — снижением гипоксии в опухоли, что, в свою очередь, снижает резистентность опухолевых клеток и восстанавливает их чувствительность к цитостатикам [20].

Выводы

На модели экспериментальной глиобластомы 101.8 у крыс показано повышение противоопухолевого эффекта доксорубицина при соче-

танном применении с донором оксида азота нитроглицерином. Можно полагать, что этот феномен обусловлен более эффективным про-

никновением доксорубина в опухоль в результате воздействия монооксида азота на церебральные сосуды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wen P.Y., Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine* 2008; 359 (5): 492—507.
2. de Lange E. C. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56 (12): 1793—1809.
3. von Holst H., Knochenhauer E., Blomgren H., Collins V.P., Ehn L., Lindquist M. et al. Uptake of adriamycin in tumour and surrounding brain tissue in patients with malignant gliomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1990; 104 (1—2): 13—16.
4. Voulgaris S., Partheni M., Karamouzis M., Dimopoulos P., Papadakis N., Kalofonos H.P. Intratumoral doxorubicin in patients with malignant brain gliomas. *Am J Clin Oncol* 2002; 25 (1): 60—64.
5. Thiel V.E., Audus K.L. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3 (2): 273—278.
6. Yamauchi A.I., Dohgu S., Nishioku T., Shuto H., Naito M., Tsuruo T. et al. An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27 (3): 263—270.
7. Gimeno G., Carpentier P. H., Desquand-Billiald S., Hanf R., Fine M. L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester cause macromolecular extravasation in the microcirculation of awake hamsters. *Eur. J. Pharmacol* 1998; 346 (2—3): 275—282.
8. Menconi M. J., Unno N., Smith M., Aguirre D. E., Fink M. P. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: Role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1425 (1): 189—203.
9. Riganti C., Miraglia E., Viarisio D., Costamagna C., Pescarmona G., Ghigo D. et al. Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux. *Cancer Res* 2005; 65 (2): 516—525.
10. Hurst R. D., Azam S., Hurst A., Clark J. B. Nitric-oxide-induced inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase may mediate reduced endothelial cell monolayer integrity in an *in vitro* model blood-brain barrier. *Brain Res* 2001; 894 (2): 181—188.
11. Yamauchi A., Dohgu S., Nishioku T., Shuto H., Naito M., Tsuruo T. An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27 (3): 263—270.
12. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. Биологическая характеристика. Клиническая и экспериментальная морфология. — 2013. — Т.4. — №8. — С. 63—69. / Khalansky A.S., Kondakova L.I. Perevivaemyj stamm gliomy krysy 101.8. Biologicheskaya kharakteristika. Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya 2013; 4 (8): 63—69 [in Russian]
13. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K. et al. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 74 (2): 157—163.
14. Wester R.C., Noonan P.K., Smeach S., Kosobud L. Pharmacokinetics and bioavailability of intravenous and topical nitroglycerin in the rhesus monkey: estimate of percutaneous first-pass metabolism. *J Pharm Sci* 1983; 72 (7): 745—748.
15. van Tellingen O., Yetkin-Arik B., de Gooijer M.C., Wesseling P., Wurdinger T., de Vries H.E. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat* 2015; 19: 1—12.
16. Sukhatme V., Bouche G., Meheus L., Sukhatme V.P., Pantziarka P. Repurposing drugs in oncology (ReDO) — nitroglycerin as anticancer agent. *Ecancermedalscience* 2015; 9: 568.
17. Garry P.S., Ezra M., Rowland M.J., Westbrook J., Pattinson K.T. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — from bench to bedside. *Exp Neurol* 2015; 263: 235—243.
18. Lagerkranser M. Effects of nitroglycerin on intracranial pressure and cerebral blood flow. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1992; 97: 34—36.
19. Weyerbrock A., Walbridge S., Pluta R.M., Saavedra J.E., Keefer L.K., Oldfield E.H. Selective opening of the blood-tumor barrier by a nitric oxide donor and long-term survival in rats with C6 gliomas. *J Neurosurg* 2003; 99 (4): 728—737.
20. Matthews N.E., Adams M.A., Maxwell L.R., Gofton T.E., Graham C.H. Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93 (24): 1879—1885.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Алексеева А.И. — младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека»; младший научный сотрудник лаборатории систем направленного транспорта Института трансляционной медицины и биотехнологии Научно-Технологического Парка Биомедицины; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России», Москва

Халанский А.С. — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва

Федосеева В. В. — научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва

Гореликов П. Л. — заведующий лабораторией нейроморфологии ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва; доцент кафедры анатомии и гистологии ФГБОУ ВПО МВА им. К. И. Скрябина, Москва

Гельперина С. Э. — начальник лаборатории систем доставки, ООО «Технология лекарств», Московская область, Химки

Исследование эффективности препаратов для терапии зоонозного кожного лейшманиоза *in vivo* на лабораторной модели

Ю. К. КУЗНЕЦОВА

Поликлиника № 2, УДП РФ, Москва

Study of the Effectiveness of Drugs for the Treatment of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis *In Vivo* on a Laboratory Model

YU. K. KUZNETSOVA

Federal state budgetary institution «Polyclinic No. 2» of the Administration of the President of the Russian Federation, Moscow

Получены подтвержденные данные о достаточной эффективности монотерапии зоонозного кожного лейшманиоза меглума антимономатом и доксициклином в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (реафероном). Лейшмании в очаге поражения на 60-й день полностью отсутствовали при лечении доксициклином. Комплексная терапия экспериментального зоонозного кожного лейшманиоза у золотистых хомяков по данным *in vivo* позволила повысить эффективность меглума антимономата и доксициклина за счёт интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного по всем показателям в сравнении с монотерапией теми же препаратами.

Ключевые слова: зоонозный кожный лейшманиоз, меглума антимономат, проблемы терапии, антибиотики, доксициклин, интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный.

Confirmed evidence of sufficient effectiveness of monotherapy of zoonotic cutaneous leishmaniasis with meglumine antimonate and doxycycline in combination with interferon alpha 2b human recombinant (reaferon) has been obtained. Leishmania in the lesion was completely absent on day 60 of treatment with doxycycline. According to *in vivo* data, the combined therapy of experimental zoonotic cutaneous leishmaniasis in golden hamsters increased the effectiveness of meglumine antimonate and doxycycline by all parameters due to the addition of recombinant human interferon alpha 2b in comparison with monotherapy with the same drugs.

Keywords: zoonotic cutaneous leishmaniasis, therapy problems, antibiotics, meglumine antimonate, doxycycline, interferon alpha 2b human recombinant.

Введение

Европейские рекомендации по управлению кожным лейшманиозом в 2013 г. предложили новый видо-направленный подход к терапии [1, 2]. Данный подход стал возможен благодаря более доступным методам молекулярной диагностики видов [3]. В целом, каждый регион (как Старый Свет, так и Новый Свет), на основе собственного опыта, имеют представление о первичной терапии, а также свои подходы к лечению. Рекомендации ВОЗ 2010 г. были в первую очередь ориентированы на эндемичные страны, не для туристов [4]. На сегодняшний день в России не существует ни одного эффективного способа или средства лечения для всех видов и синдромов кожного лейшманиоза (КЛ), что представляет серьёзную проблему для практического здравоохранения [5, 6].

© Ю. К. Кузнецова, 2018

Адрес для корреспонденции: E-mail: julkuz1008@yandex.ru

Исследования, проведённые 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* [7]. Позднее его обнаружили в *L.braziliensis* и указали на связь с более тяжёлым течением КЛ вплоть до развития кожно-слизистого лейшманиоза [8]. Авторами установлена корреляция между наличием вируса и иммунным ответом хозяина, что может служить прогностическим критерием тяжести лейшманиоза и распространения инфекции по лимфатической системе. 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

меглумина антимономатом, от песчанки *Rhombomys opimus* [9]. 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 [10]. По сути, мы имеем дело с эндоцитобиозом вируса внутри лейшманий. Лейшманиями, содержащими LRV, и безвирусными паразитами заражали хомяков. Доказано, в первом случае имел место сильный воспалительный ответ за счёт повышения уровня IFN- β . Установлено продление выживаемости паразитов с вирусом [11, 12].

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

Материал и методы

В данных исследованиях изучалась эффективность следующих препаратов: доксициклина, цефотаксима, цефтриаксона, меглумина антимономата (МА) и интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (ИФ).

МА давно зарекомендовал себя как эффективное средство, рекомендованное авторитетными организациями. Однако данный препарат достаточно токсичный. Поэтому одной из задач было попытаться уменьшить токсичность, сохранив или усилив эффективность этого препарата, путём дополнительного введения ИФ.

По данным некоторых исследований [13, 14], тетрациклины показали некоторую эффективность в лечении кожного лейшманиоза. С уровнем эффективности 71 %, доксициклин сравним с пятивалентной сурьмой, эффективность которой составляет от 60 до 90 %. Несмотря на то что механизм действия пятивалентной сурьмы хорошо известен (ингибирование аденозинтрифосфата синтетазы паразита) [15], механизм действия доксициклина до сих пор обсуждается. Доксициклин, возможно, может представлять терапевтическую альтернативу в лечении кожного лейшманиоза, особенно в эндемичных зонах, обеспечивая лучшую переносимость и более низкую стоимость. Одним из изучаемых препаратов, стал клафоран (цефотаксим). Изучая и анализируя литературные источники, статьи о лечении КЛ в международных базах данных, таких как MEDLINE, EMBASE, Web of Science и Cochrane Library, были найдены публикации о возможной противолейшманиальной активности препарата клафоран [5]. Цефтриаксон также был включен в исследование, как препарат, относящийся к III поколению цефалоспоринов (как и цефотаксим). Опубликованных данных по применению при кожном лейшманиозе цефтриаксона не обнаружено.

В данном исследовании в качестве лабораторной модели использовались GSH (классическая модель висцерального лейшманиоза). Они обладают более высокой восприимчивостью к заболеванию. Заражение животных в эксперименте *in vivo* выполнялось на животных 2-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.

Формирование всех опытных групп проводилось с учётом 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 по (2012 г).

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 их вирулентность утрачивается, использована биомасса после 1—2 пассажей.

Методика заражения патологическим материалом. Для заражения использовали 10—14-дневную культуру. Подсчёт промастигот производили в камере Горяева. Затем готовили такую взвесь, которая содержала 10^6 паразитов в объёме 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 испытываемых 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) сроки клинического выздоровления, 2) средняя прибавка массы тела GSH, 3) средняя степень местного поражения на коже, 4) среднее число лейшманий, выявленных микроскопически. 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.

Методология испытаний. Для изучения эффективности монотерапии перечисленными препаратами на первом этапе испытаний использовались лабораторные модели золотистых хомяков по 30 животных в каждой группе. Вторая серия опытов посвящена сравнению монотерапии МА и комбинированной терапии, включающей МА + ИФ. Третья серия опытов была направлена на изучение эффективности комбинированной терапии доксициклином в сочетании с ИФ. Во второй и третьей серии опытов использовались лабораторные модели по 24 разнополых GSH в каждой группе.

Формирование всех опытных групп проводилось с учётом массы тела животного, однозначности клинических проявлений на коже и длительности существования язвы. В соответствии с этими показателями лабораторные модели животных были репрезентативными.

Результаты и обсуждения

Инкубационный период экспериментального зоонозного КЛ (ЗКЛ) у хомяков колебался от 1 до 8 мес., 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.

Показатели эффективности противолейшманиальных препаратов в эксперименте *in vivo* на GSH: меглумина антимоноат (МА), доксициклин (ДЦ), интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (ИФ) и их комбинаций — меглумина антимоноат + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (МА + ИФ), доксициклин + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (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	3,2±0,7	3,1±0,8	3,2±0,6	3,2±0,8	3,1±0,7
Микроскопия/число лейшманий	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	1,2±0,7	1,07±0,70	1,07±0,74	0,46±0,5	0,042±0,02
Микроскопия/число лейшманий	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	0,1±0,03	0,07±0,01	0,17±0,08	0	0
Микроскопия/число лейшманий	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

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. 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 её дно обильно покрывалось гнойным налётом, и отделялся гнойный экссудат. У трети — 52 (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 в области 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. 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:

$$S=1/2D \times 1/2d \times \pi$$

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 кор-

ку. Большое количество лейшманий, расположенных в макрофагах и свободно лежащих, свидетельствовало о наличии специфического процесса. 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.

Результаты оценки эффективности лечения МА — контрольная группа экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков. Для изучения эффективности МА 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. Максимально число инъекций завилло от результатов клинического выздоровления и составляло 6—7. Средняя масса лабораторной модели в данной серии опытов составила 107,8±1,7 г (таблица). При лечении МА экспериментальной модели ЗКЛ у золотистых хомяков смертности животных не зарегистрировано. В течение первых 2 нед. отмечено снижение активности животных, потеря аппетита и незначительное уменьшение массы тела. Однако впоследствии состояние животных стабилизировалось. Выздоровление животных происходило в течение 2 мес., в среднем за 40,7±3,2 дня. На 30-й день после начала введения МА 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 ($1,5 \pm 0,5$ против $3,5 \pm 0,4$) ($p < 0,05$). На 60-й день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составила $5,0 \pm 1,1$ г. Рубцевание язв наступило у всех хомяков, что соответствовало степени местного поражения, равной 0. Степень местного поражения уменьшилась в 32 раза ($0,1 \pm 0,03$ против $3,2 \pm 0,7$) ($p < 0,05$). Рубцевание язв наступило у всех GSH 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 МА, 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 ($0,1 \pm 0,03$).

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 (МА $40,7 \pm 3,2$ дня) ($p < 0,05$). С самого начала животные переносили лечение без каких-либо побочных реакций. На 30-й день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела хомяков составила $5,8 \pm 3,2$ г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 3 нед., средний размер язвы равнялся 0 см. Степень местного поражения составляла $1,07 \pm 0,7$ 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 $1,27 \pm 0,45$ лейшманий в мазке из очага поражения. Это в 2,9 меньше, чем до начала терапии ($3,7 \pm 0,3$) ($p < 0,05$) и на $0,23$ меньше, чем при лечении МА ($1,5 \pm 0,5$) ($p > 0,05$). Существенно, что на 60-й день эксперимента по сравнению с его началом, животные прибавили в массе тела, в среднем на $10,0 \pm 3,0$ г. Степень местного пораже-

ния была минимальной — $0,07 \pm 0,01$ (контроль $0,1 \pm 0,03$). Результаты микроскопического исследования соответствовали $0,03 \pm 0,01$ лейшманий в мазке из очага поражения, что в 20 раз меньше, чем в контроле ($0,6 \pm 0,6$) ($p < 0,05$).

Подводя итог данному исследованию, можно заключить, что по всем критериям доксициклин более эффективен, чем МА, 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 результатов микроскопического исследования лейшманий в мазке из очага поражения ($0,6 \pm 0,6$ и $0,03 \pm 0,01$) ($p < 0,05$).

Результаты оценки эффективности лечения цефотаксимом 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. При лечении цефтриаксоном экспериментальной модели ЗКЛ у GSH 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 $2,83 \pm 0,75$ ($p > 0,05$). По результатам микроскопического исследования количество лейшманий в мазке из очага поражения ($2,77 \pm 0,73$) несколько снизилось ($p < 0,05$), 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 GSH, экспериментально зараженных промастиготами лейшманий, наступает гибель животных. Это согласуется с полученными ранее данными.

Результаты оценки эффективности лечения интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков. Для изучения эффективности монотерапии ИФ на модели ЗКЛ использованы 30 GSH. Препарат вводили 1 раз в неделю в дозе $164,410$ МЕ на 100 г массы лабораторной модели. Макси-

мальное число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышало 4—5. Средняя масса лабораторной модели в данной серии опытов составила $109,5 \pm 1,9$ г. Средний размер язв до начала терапии составлял $0,49 \text{ см}^2$. При лечении ИФ экспериментальной модели ЗКЛ у смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление животных происходило в течение месяца, в среднем за $27,2 \pm 3,8$ дня. С самого начала лечения животные переносили его без каких-либо побочных реакций. На 30-й день, по сравнению с началом эксперимента, средняя прибавка массы тела составила $16,7 \pm 4,2$ г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 4 нед., 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-й 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 $3,7 \pm 0,4$). Можно заключить, что сроки разрешения клинических проявлений на коже при использовании ИФ были всего на неделю больше, чем при использовании доксициклина и на 2 недели меньше, чем МА. Прибавка массы тела при использовании интерферона была максимальной (25%) по сравнению с доксициклином (9,7%) и МА (4,6%). Степень местного поражения на 30-й день у доксициклина и ИФ не отличалась ($1,07 \pm 0,7$) и была меньше, чем у МА ($1,2 \pm 0,7$). 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 МА ($0,6 \pm 0,6$) и максимальный по выявлению лейшманий — у ИФ ($1,17 \pm 0,38$). Можно полагать, что ИФ, 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 МА в сочетании с ИФ и доксициклин в сочетании с ИФ.

Результаты оценки эффективности комбинированного лечения меллума антимоном (глюкантимоном) + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (реаферон) экспериментального

ЗКЛ у золотистых хомяков. Для изучения эффективности комбинированной терапии МА + ИФ на модели ЗКЛ использованы 24 GSH. 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 $110,5 \pm 3,6$ г. Средний размер язв до начала терапии составлял $0,47 \text{ см}^2$. При лечении МА + ИФ экспериментальной модели ЗКЛ у GSH смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление животных происходило в течение месяца, в среднем за $22,1 \pm 1,2$ дня. С самого начала животные переносили лечение без каких-либо побочных реакций. На 30-й день, по сравнению с началом эксперимента, средняя прибавка массы тела составила $25,5 \pm 4,9$ г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 4 нед., средний размер язвы равнялся 0 см^2 . Степень местного поражения уменьшилась в 7 раз ($0,46 \pm 0,5$ против $3,2 \pm 0,8$) ($p < 0,05$), 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 ($1,3 \pm 0,46$ против $3,7 \pm 0,3$) ($p < 0,05$). На 60-й день, по сравнению с началом эксперимента, средняя прибавка массы тела составила 23,2% ($25,6 \pm 3,8$ г). Степень местного поражения равнялась 0 см^2 , 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 МА в сочетании с ИФ были на 3 нед. или в 1,8 раза меньше, чем при использовании МА ($22,1 \pm 1,2$ дня против $40,7 \pm 3,2$ дней) ($p < 0,05$). Прибавка массы тела животных на 30-й 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-й 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 $0,6 \pm 0,6$) ($p < 0,05$).

Результаты эффективности комбинированного лечения доксициклином + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков. Для изучения эффек-

тивности комбинированной терапии доксициклином в сочетании с ИФ на модели ЗКЛ использованы 24 GSH. Препараты вводили 1 раз в неделю одновременно разными шприцами внутримышечно в симметричные участки тела (бедра). Доза доксициклина составляла 0,0003 г. на 100 г. массы лабораторной модели, а доза ИФ — 156146 МЕ. Максимально число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышала 3–4. Средняя масса лабораторной модели в данной серии опытов составила $103,3 \pm 1,1$ г, Средний размер язв до начала терапии составлял $0,46 \text{ см}^2$. При комбинированной терапии доксициклином в сочетании с ИФ экспериментальной модели ЗКЛ у GSH 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-й день, по сравнению с началом эксперимента, средняя прибавка массы тела составила $31,5 \pm 1,3$ г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 3 нед., 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 $0,9 \pm 0,3$) ($p < 0,05$). На 60-й 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 уменьшился 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 доксициклина и комбинированной терапии доксициклина с ИФ были идентичными ($19,2 \pm 0,9$ дня и $20,1 \pm 2,3$) ($p > 0,05$). Прибавка массы тела животных на 30-й 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-й день при полном рубцевании язв у животных при комбинированной терапии и монотерапии в мазках лейшмании отсутствовали.

Заключение

Инкубационный период экспериментального ЗКЛ у хомяков колебался от 1 до 8 мес., составляя в среднем $76,8 \pm 21,8$ дня. У 58,1% животных клинические проявления ЗКЛ возникали 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%) наблюдался редко. При локализации язв на ушных раковинах наблюдалось частичное или полное расплавление хрящевой ткани.

При введении *in vivo* цефтриаксона и цефотаксима в терапевтической дозе происходила гибель лабораторных животных. Монотерапия меглумина антимономатом, доксициклином и интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным достаточно эффективна и не различается к 30-му 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-й день полностью отсутствовали при лечении доксициклином.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Blum J., Buffet P., Visser L., Harms G., Bailey M.S., Caumes E. et al. LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers. J Travel Med 2014; 21: 116–129.
- Hodiamont C., Kager P., Bart A., de Vries H.J., van Thiel P.P., Leenstra T. et al. Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: a comprehensive guide. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8: e2832.
- Van der Auwera G., Dujardin J. Species typing in dermal leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2015; 28: 265–294.
- WHO, 2010. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series 949: 1–186.
- Кузнецова Ю.К., Сергеев В.П., Кузнецова К.Ю. Исторические аспекты лечения кожного лейшманиоза. Антибиотики и химиотер. — 2017. — Т. 62. — № 3–4. — С. 53–57. / Kuznetsova Yu.K., Sergeev V.P., Kuznetsova K.Yu. Istoricheskie aspekty lecheniya kozhnogo leyshmanioza. Antibiotiki i khimioter 2017; 62: 3–4: 53–57. [in Russian]
- Кузнецова Ю.К., Янг Д. Исторические аспекты лечения кожного лейшманиоза. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2017. — № 1. — С. 33–35. / Kuznetsova Yu.K., Yang D. Istoricheskie aspekty lecheniya kozhnogo leyshmanioza. Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni 2017; 1: 33–35. [in Russian]
- Tarr P.I., Aline R.F. Jr., Smiley B.L., Scholler J., Keithly J., Stuart K. LRI: a candidate RNA virus of Leishmania. Proc Natl Acad Sci USA 1988 Dec; 85 (24): 9572–5.

8. Kariyawasam R., Grewal J., Lau R., Purssell A., Valencia B.M., Llanos-Cuentas A. *et al.* Influence of Leishmania RNA Virus 1 on Proinflammatory Biomarker Expression in a Human Macrophage Model of American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis* 2017 Oct 17; 216 (7): 877—886.
9. Hajjarian H. Mahdi M., Mohebbali M., Samimi-Rad K., Ataei-Pirkooh A., Kazemi-Rad E. *et al.* Detection and molecular identification of leishmania RNA virus (LRV) in Iranian Leishmania species. *Arch Virol* 2016 Dec; 161 (12): 3385—3390. Epub 2016 Sep 7.
10. Hartley M.A., Drexler S., Ronet C., Beverley S.M., Fasel N. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2014 Aug; 30 (8): 412—22. doi: 10.1016/j.pt.2014.05.006. Epub 2014 Jun 20.
11. Кузнецова Ю.К. Сравнительные данные противолейшманиальной активности антибактериальных препаратов отечественного производства, полученные в экспериментальных исследованиях *in vitro*. Здоровье населения и среда обитания. — 2017. — № 1 (286). — С. 50—51. / Kuznetsova Yu.K. Sravnitel'nye dannye protivoleyshmanial'noy aktivnosti antibakterial'nykh preparatov otechestvennogo proizvodstva, poluchennye v eksperimental'nykh issledovaniyakh *in vitro*. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya* 2017; 1 (286): 50—51. [in Russian]
12. Кузнецова Ю.К. Кожный лейшманиоз: причины резистентности терапии. Проблемы медицинской микологии. — 2018. — Т. 20. — № 2. / Kuznetsova Yu.K. Skin leishmaniasis: reasons for the resistance of therapy. *Problems in medical mycology* 2018; 20: 2. [in Russian]
13. Masmoudi A., Dammak A., Chaaben H., Maalej N., Akrouf F., Turki H. Doxycycline for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Dermatology Online Journal* 2008; 14 (8).
14. Khairulin F.Ia., Ereshov M.E., Khuseinova Kh.Kh., Rozyreva A.A., Sukhanova T.A. Treatment of cutaneous leishmaniasis with methacycline and doxycycline (vibramycin). *Vestn Dermatol Venerol* 1989; 3: 62—66.
15. William H. M., Khaldoun M. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment. *Am Fam Phys* 2004; 69: 455—460.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Юлия Константиновна — врач-дерматовенеролог ФГБУ «Поликлиника 2» УДП РФ, Москва

Активность препарата бактериофагов в отношении антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов El Tor

А. В. ТЮРИНА, Н. Е. ГАЕВСКАЯ, Н. А. СЕЛЯНСКАЯ, Л. А. ЕГИАЗАРЯН,
М. П. ПОГОЖОВА, С. Н. ГОЛОВИН, Н. И. ПАСЮКОВА

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

Activity of Bacteriophage Preparation in Relation to Antibiotic-Resistant El Tor Strain of *Vibrio Cholerae*

A. V. TYURINA, N. E. GAEVSKAYA, N. A. SELYANSKAYA, L. A. EGIAZARYAN,
M. P. POGOZHNOVA, S. N. GOLOVIN, N. I. PASYUKOVA

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of the The Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, Rostov-on-Don

Распространение штаммов *Vibrio cholerae*, обладающих множественной антибиотикоустойчивостью, вызывает необходимость поиска альтернативных антибиотикам средств, эффективных в отношении возбудителя холеры. Цель исследования: изучить *in vitro* и *in vivo* литическую активность холерных фагов из коллекции лаборатории бактериофагов в отношении антибиотикорезистентных геновариантов *V.cholerae* El Tor. В результате работы *in vitro* определены перспективные для проведения фаготерапии экспериментальной холеры фаги. Сравнительная оценка эффективности применения фаговой смеси в отношении антибиотикорезистентного штамма *V.cholerae* El Tor 19243 *in vivo* на модели генерализованной формы инфекции у белых мышей показала высокую эффективность её профилактического и лечебного использования (более 70 % выживших животных).

Ключевые слова: холерные бактериофаги, полиантибиотикорезистентные штаммы, фагопрофилактика, антибактериальные препараты.

The spread of *Vibrio cholerae* strains with multiple antibiotic resistances makes it necessary to search for alternative antibiotics that are effective against the cholera pathogen. The aim of the study was to investigate the lytic activity of cholera phages from the collection of the bacteriophage laboratory *in vitro* and *in vivo* with respect to antibiotic-resistant genovariants of *V.cholerae* El Tor. As a result of the *in vitro* study, it was possible to identify the promising phages for phagotherapy of experimental cholera. Comparative evaluation of the effectiveness of the phage mixture in relation to the antibiotic-resistant El Tor 19243 strain of *V.cholerae* *in vivo* on a model of a generalized infection in white mice showed high effectiveness of its preventive and therapeutic use (more than 70% of surviving animals).

Keywords: cholera bacteriophages, poly-antibiotic-resistant strains, phage prophylaxis, antibacterial drugs.

На современном этапе седьмой пандемии, холера продолжает оставаться приоритетной проблемой мирового здравоохранения [1]. Угроза возникновения масштабных эпидемий и вспышек этой инфекции на различных континентах мира определяет необходимость постоянного мониторинга холеры, предотвращения её распространения, подчеркивает важность оптимизации современной терапии [2].

Тревожные сообщения, свидетельствующие о выделении в различных регионах мира штаммов *Vibrio cholerae*, устойчивых к ряду антибактериальных препаратов [3], вызывают необходимость

поиска альтернативных антибиотикам средств, эффективных в отношении возбудителя холеры.

В связи с этим, актуальны исследования бактериофагов, преимущество которых является способность поражать как чувствительные, так и полиантибиотикорезистентные штаммы возбудителей инфекций [4].

Важной особенностью фаготерапии является накопление в месте локализации воспалительного процесса, элиминация бактериальных возбудителей без подавления нормальной микрофлоры [5], возможность быстрого пополнения их состава безопасными литическими фагами, преодолевающими возникающую фагоустойчивость бактерий [6], узкая специфичность, позволяющая элиминировать конкретный микроорганизм, не оказывая влияния на микробиоту человеческого организма, а также возможность использо-

вать комплексные препараты, содержащие несколько фагов разной специфичности в случае необходимости [7].

В России, Грузии и Польше бактериофаги успешно используются в терапии у людей таких инфекционных заболеваний, как дизентерия, брюшной тиф, паратифоидная лихорадка, пиогенные инфекции и инфекции мочевых путей [8]. При этом важен продолжительный период циркуляции вирусного агента в организме больного для обеспечения антибактериального действия [9].

Также в результате проведенных клинических исследований, посредством стимуляции иммунных реакций человека, было показано, что бактериофаги могут оказывать влияние на различные функции основных популяций клеток иммунной системы человека [10]. Прикрепляясь к слизистой кишечника, фаги участвуют в селективном уничтожении патогенных бактерий, являясь тем самым составным звеном врожденного и приобретенного иммунитета. Следовательно, препараты бактериофагов могут применяться не только в терапии инфекционных заболеваний, они могут выполнять и пробиотические функции, модулируя иммунитет подобно пробиотическим бактериям. Фаги способны лимитировать перемещение бактерий элиминированием чувствительных штаммов и уменьшать воспаление, вызванное иммунным ответом на бактериальную транслокацию [11].

Фаготерапия способна повышать действие антибиотиков, а в некоторых случаях может быть эффективнее, чем использование таких препаратов, как тетрациклин, стрептомицин, ампициллин или триметоприм/сульфаметоксазол. Кроме того, установлено, при этиотропной терапии фагами бактерии становятся менее вирулентными [12]. Поэтому, препараты на основе бактериофагов могут стать более эффективными, чем обычные антибиотики. Белки, являющиеся «действующим веществом вируса», являются прообразами возможных препаратов нового поколения, к которым бактерии не смогут выработать устойчивость [13].

Ранее в работе Н. Е. Гаевской (2004 г.) было показано, что при отборе холерных бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, наибольшей литической активностью и широким диапазоном действия обладали фаги МЗ и С. Выделенный холерный фаг К1 Вир, также, как и фаг ФБ избирательно лизировали только по 5 штаммов *V.cholerae* Classical, в связи с чем они не могут быть использованы в лечебных целях. Из лизогенных холерных штаммов были изолированы фаги, идентичные по антигенной структуре фагам «Каппа» или «Суф» [14].

Кроме того, Т. А. Кудряковой (2005 г.) проводились испытания антибактериальной активности музейных рас холерных бактериофагов и её изменение при пассажах *in vivo*. В результате много-

кратных пассажей трёх холерных фагов в организме белых мышей, инфицированных внутрибрюшинно холерными вибрионами вирулентного штамма El Tor P-5879, были получены новые штаммы бактериофагов 455ж, К1 Вир, 3900ж. Полученные результаты позволили заключить, что экспериментальные расы холерных фагов К1 Вир. и 3900ж обладали большим, чем исходные фаги, диапазоном действия и были отобраны как наиболее перспективные для конструирования бивалентного препарата фага [15].

Однако исследования в отношении геновариантов Эль Тор, циркулирующих в настоящее время, ещё не проводились.

Цель работы — изучить *in vitro* и *in vivo* литическую активность холерных фагов из коллекции лаборатории бактериофагов в отношении антибиотикорезистентных геновариантов *V.cholerae* El Tor.

Материал и методы

В работу были отобраны холерные фаги из коллекции лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, лизирующие вибрионы О1 серогруппы биоваров Classical и El Tor.

Изучение свойств бактериофагов проводили общепринятыми методами [16].

Питательные среды включали бульон Мартена, 0,7% и 1,5% агар Мартена (рН 7,7).

В опытах *in vivo* использовали штамм *V.cholerae* El Tor 19243 (ctx+, tcp+), выделенный от больного в 2012 г. (г. Москва), из коллекции лаборатории МЖК с ЦПВ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Белых мышей массой 18–20 г. заражали внутрибрюшинно взвесью 18-часовой агаровой культуры (37°C) холерного вибриона в 0,3% агаризованном 0,9% растворе хлорида натрия в дозе 10^8 м.к. в 0,2 мл.

Лечение антибактериальными препаратами начинали сразу после заражения и проводили в течение 3 дней (один раз в сутки).

Фаговую смесь вводили перорально в объёме 0,5 мл в концентрации $n \times 10^{-9}$ – $n \times 10^{-10}$ БОЕ/мл, один раз в сутки в течение 3 сут перед заражением (профилактика), либо одновременно с заражением с последующим трехдневным введением один раз в сутки (лечение), а также по три дня до и после заражения (профилактика с лечением).

Сравнительное изучение эффективности антибактериальных препаратов и фагов осуществляли в одном опыте, количество опытов не менее двух при числе животных в группе не менее 10. Наблюдение за животными осуществляли в течение 10 дней. Проводили бактериологический контроль заражения и эффективности лечения. Опыт учитывали при 100% гибели контрольных (нелеченых) животных.

Выбор антибактериальных препаратов соответствовал рекомендуемому для лечения холеры [17].

Дозы препаратов рассчитывали по формуле J. E. Paget, J. M. Barnes [18], исходя из среднесуточных человекодоз.

Статистическую обработку данных проводили по таблице А. Я. Боярского, для вероятности 95–99% [19].

При работе с животными руководствовались законодательством Российской Федерации и Директивой европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [20].

Определение чувствительности штамма *V.cholerae* к антибактериальным препаратам проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [21].

Таблица 1. Эффективность антибактериальных препаратов при генерализованной форме инфекции у белых мышей, вызванной *V.cholerae* El Tor 19243

Антибактериальный препарат	Значение МПК, мг/л	Суточная доза препарата		Способ введения	Выжившие животные, % + I ₉₅
		мг/мышь/сут	мг/кг/сут*		
Доксициклин	2,0	2,0	8,0	Перорально	100
Тетрациклин	1,0	10,0	40,0	То же	80 18
Левомецетин	8,0	10,0	40,0	—//—	70 21
Гентамицин	4,0	1,0	4,0	В/м**	100
Канамицин	8,0	2,0	8,0	То же	100
Стрептомицин	512,0	2,0	8,0	—//—	0
Рифампицин	2,0	2,0	8,0	Перорально	100
Фуразолидон	32,0	4,0	16,0	То же	0
Триметоприм/сульфаметоксазол	128,0/640,0	1,65/8,35	6,7/ 33,3	То же	0
Налидиксовая кислота	256,0	15,0	60,0	—//—	0
Контроль					0

Примечание. * — соответствующая суточная человекодоза; ** — внутримышечное введение.

Таблица 2. Эффективность фаговой смеси при генерализованной форме инфекции у белых мышей, вызванной штаммом *V.cholerae* El Tor 19243

Группы подопытных животных	Выжившие животные, % + I ₉₅
Профилактика фагами	70±21
Лечение фагами	90±14
Профилактика фагами + лечение фагами	100
Контроль	0

Примечание. * — соответствующая суточная человекодоза; ** — внутримышечное введение.

Результаты и обсуждения

Была проведена *in vitro* сравнительная оценка бактериофагов холерных вибрионов из коллекции лаборатории бактериофагов с целью подбора наиболее эффективных штаммов фагов. При отборе фагов учитывались следующие показатели: специфичность литического действия в отношении вибрионов, максимально высокая репродуктивная активность, степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

Перспективными для проведения фаготерапии экспериментальной холеры оказались холерные фаги обладающие высокой литической активностью и являющиеся вирулентными. Спектр литической активности одного из фагов имеет широкий диапазон, включающий холерные вибрионы биоваров Classical и El Tor. Диапазон литической активности второго фага распространяется только на холерные вибрионы биовара El Tor, но в высоком проценте (70%). По данным электронно-микроскопического исследования, эти холерные бактериофаги относились к III морфогруппе (А. С. Тихоненко, 1968) и типу семейства *Podoviridae* (Н. В. Ackerman, 1987), но к разным серологическим типам холерных фагов [22].

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*.

Антибиотикограмма штамма *V.cholerae* El Tor 19243 показала чувствительность к тетрациклину, доксициклину, левомецетину, гентамицину, канамицину, рифампицину и устойчивость к стрептомицину, фуразолидону, триметоприму/суль-

фаметоксазолу, налидиксовой кислоте. Значения МПК этих препаратов приведены в табл. 1.

В опытах *in vivo* устойчивость культуры *V.cholerae* El Tor 19243 к налидиксовой кислоте, стрептомицину, триметоприму/сульфаметоксазолу, фуразолидону обуславливала неэффективность этих препаратов при инфекции у мышей (табл. 1).

Препараты, к которым заражающий штамм был чувствителен *in vitro*, продемонстрировали эффективность для 70—100% животных (см. табл. 1).

Профилактическое применение бактериофагов перед заражением защищало от развития инфекционного процесса 70±21% животных (табл. 2).

Эффективность фаготерапии, а также совместного использования фагов и для лечения, и для профилактики, не уступала действию эффективных антибактериальных препаратов (90±14% выживших животных) (табл. 2).

Аналогичные результаты были получены Т. S. Bhowmick et al. (2009), А. Jaiswal et al. (2014), М. Yen et al. (2017) на модели RITARD [23—25]. Было отмечено, что пероральное введение фагового коктейля (1×10⁸ БОЕ/мл) как перед, так и после заражения *V.cholerae* O1 значительно уменьшало выделение бактерий ($p<0,01$) и тяжесть диареи, снижало уровень воспалительных цитокинов (IL-6 и TNF-альфа).

Заключение

Таким образом, эксперимент показал высокую эффективность профилактического и лечебного использования данной фаговой смеси в отношении антибиотикорезистентного штамма *V.cholerae* El Tor 19243 на модели генерализованной формы инфекции у белых мышей (более 70% выживших

животных). Также, спектр литической активности фаговой смеси может быть расширен добавлением

к ней моновиовых смесей других видов (после доказательства их литической природы).

ЛИТЕРАТУРА

1. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Арешина О.А., Адаменко О.Л., Назаретян А.А., Анисимова Г.Б. Эпидемиологические особенности холеры на современном этапе седьмой пандемии. Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2014. — № 4. — С. 45. / Moskviitina E.A., Mazrukho A.B., Areshina O.A., Adamenko O.L., Nazaretyan A.A., Anisimova G.B. Epidemiologicheskie osobennosti kholery na sovremennom etape sed'moy pandemii. Epidemiologiia i infeksionnye bolezni 2014; 4: 45. [in Russian]
2. Титова С.В., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д. Современные подходы к мониторингу холеры. Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, 2015. — № 28. — С. 10–16. / Titova S.V., Moskviitina E.A., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Kruglikov V.D. Sovremennye podkhody k monitoringu kholery. Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony. Rostov-na-Donu, 2015; 28: 10–16. [in Russian]
3. Егизарян Л.А., Селянская Н.А., Захарова И.Б., Подшивалова М.В., Березняк Е.А., Веркина Л.М., Тришина А.В. Антибиоткорезистентность холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации в 2006–2015 гг. Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2017. — Т. 22. — № 1. — С. 25–30. / Egizaryan L.A., Selyanskaya N.A., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Bereznyak E.A., Verkina L.M., Trishina A.V. Antibiotkorozistentnost' kholernykh vibriinov El' Tor, vydelennykh na territorii Rossiyskoy Federatsii v 2006–2015 gg. Epidemiologiia i infeksionnye bolezni. 2017; 22 (1): 25–30. [in Russian]
4. Бондаренко В.М. Новые горизонты бактериофаготерапии. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). 2013; 4: 1. / Bondarenko V.M. Novye gorizonty bakteriofagoterapii. Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN (elektronny zhurnal). 2013; 4: 1. [in Russian]
5. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. Bacteriophage therapy (minireview). Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3: 649–659.
6. Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Буркальцева М.В. Новый подход к составлению смесей бактериофагов антибактериальной терапии. Журн микробиол. — 2016. — № 5. — С. 3–11. / Pleteneva E.A., Shaburova O.V., Burkal'tseva M.V. Novyy podkhod k sostavleniyu smesey bakteriofagov antibakterial'noy terapii. Zhurn mikrobiol. 2016; 5: 3–11.
7. Тикунова Н.В., Власов В.В. Бактериофаги-враги наших врагов. Человек. 2013. 59–69. / Tikunova N.V., Vlasov V.V. Bakteriofagi-vragi nashikh vrugov. Chelovek. 2013. 59–69.
8. Chanishvili N. Phage therapy — history from Twort and d' Herelle through Soviet experience to current approaches. Adv Virus Res 2012; 83: 3–40.
9. Merrill C.R., Biswas B., Carlton R. et al. Long — circulating bacteriophage as antibacterial agents. Proc Natl Acad Sci USA 1966; 93: 3188–3192.
10. Borysowski J., Dbrowska K., Ohams M. et al. The response of the immune system to phage: potential associations with phage therapy Abstract book conference: «Bacteriophages and Probiotics — Alternatives to Antibiotics» dedicated to the 120th birth anniversary of Professor George Eliava, July 1–4, 2012. Tbilisi, Georgia. 2012: 33.
11. Бондаревич Н.В., Новик Г.И. Бактериофаги и иммунный ответ организма человека. Весті нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. — 2015. — № 2. — С. 112–116. / Bondarevich N.V., Novik G.I. Bakteriofagi i immunnyy otvet organizma cheloveka. Vestsi natsyanal'nay akademii navuk Belarusi. 2015; 2: 112–116. [in Russian]
12. Лазарева Е.Б. Бактериофаги для лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Антибиотики и химиотер. — 2003. — Т. 48. — № 1. — С. 36–40. / Lazareva E.B. Bakteriofagi dlya lecheniya i profilaktiki infeksionnykh zabolevaniy. Antibiotiki i khimioter. 2003; 48 (1): 36–40. [in Russian]
13. Камтер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение. Пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. — М.: Науч. мир, 2012. — 636. / Bakteriofagi: biologiia i prakticheskoe primenenie. Per. s angl.: kolektiv per.; nauch. red. rus. izd. A.V. Letarov. M.: nauch. mir, 2012; 636. [in Russian]
14. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Мakedонова Л.Д., Качкина Г.В., Алиева А.А., Саямов С.Р. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими холерными вибрионами. Современные наукоемкие технологии. — 2004. — № 3. — С. 11–15. / Gaevskaya N.E., Kudryakova T.A., Makedonova L.D., Kachkina G.V., Alieva A.A., Sayamov S.R. Otkor bakteriofagov dlya lecheniya eksperimental'noy kholery, vyzvannoy klassicheskimi kholernymi vibrionomi. Sovremennye naukoemkie tekhnologii. 2004; 3: 11–15. [in Russian]
15. Кудрякова Т.А., Мakedонова Л.Д., Качкина Г.В., Гаевская Н.Е., Саямов С.Р. Испытание антибактериальной активности музейных рас холерных бактериофагов и ее изменение при пассажах in vivo. Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, 2003. — № 18. — С. 147–150. / Kudryakova T.A., Makedonova L.D., Kachkina G.V., Gaevskaya N.E., Sayamov S.R. Ispytanie antibakterial'noy aktivnosti muzeynykh ras kholernykh bakteriofagov i ee izmenenie pri passazhakh in vivo. Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony. Rostov-na-Donu, 2003; 18: 147–150. [in Russian]
16. Адамс М. Бактериофаги. М.: 1961. — 522 с. / Adams M. Bakteriofagi. M.: 1961; 522.
17. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» М.: 2009; 75. / Sanitarно-epidemiologicheskie pravila SP 3.1.1.2521-09 «Profilaktika kholery. Obshchie trebovaniya k epidemiologicheskomu nadzoru za kholeroy na territorii Rossiyskoy Federatsii» M.: 2009. 75. [in Russian]
18. Paget J.E., Barne Y.M. Toxicity tests. Evaluation of drug activities pharmacometric. London, 1964; 1: 135–167.
19. Боярский А.Я. Статистические методы в экспериментальных медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1955. — 262. / Boyarskiy A.Ya. Statisticheskie metody v eksperimental'nykh meditsinskikh issledovaniyakh. M.: Meditsina, 1955; 262. [in Russian]
20. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. С16: 48. / Direktiva 2010/63/EU Evropeyskogo parlamenta i soвета Evropeyskogo soyuza po okhrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh. SPb.: 48. [in Russian]
21. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. — МУК 4.2.2495-09. М.: 2009. — 59. / Opredelenie chuvstvitel'nosti возбуdiviteley opasnykh bakterial'nykh infektsiy (chuma, sibirskaya yazva, kholera, tulyaremiya, brutsellez, sap, melioidoz) k antibakterial'nym preparatam. MUK 4.2.2495-09. M.: 2009; 59. [in Russian]
22. Gaevskaya N.E., Kudryakova T.A., Makedonskaya L.D. Bacteriophages of pathogenic vibrios, identification, differentiation. Bacteriophages an overview and synthesis of a re-emerging field New York, 2017.1–30.
23. Bhowmick T.S., Koley H., Das M., Saha D.R., Sarkar B.L. Pathogenic potential of Vibrio phages against an experimental infection with *Vibrio cholerae* O1 in the RITARD model. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33 (6): 569–573.
24. Jaiswal A., Koley H., Mitra S., Saha D.R., Sarkar B. Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice. Int J Med Microbiol. 2014; 304 (3–4): 422–30.
25. Yen M., Cairns L.S., Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. Nat Commun. 2017; 1; 8: 14187.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Тюрина Анна Владимировна — м. н. с. лаборатории бактериофагов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Гаевская Наталья Евгеньевна — к. м. н., зав. лаборатории бактериофагов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Селянская Надежда Александровна — к. м. н., с. н. с. лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Егизарян Лиана Альбертовна — м. н. с. лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ, ФКУЗ Ростов-

ский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Погожова Марина Павловна — м. н. с. лаборатории бактериофагов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Головин Сергей Николаевич — лаборант лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Пасюкова Нина Ивановна — научный сотрудник лаборатории экспериментально-биологических моделей, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Варибельность генов рекомбиназ и *mecA* стафилококковой хромосомной кассеты *Staphylococcus haemolyticus*

А. В. ПОЛОНСКАЯ¹, *М. А. КОРНИЕНКО¹, А. И. МАНОЛОВ¹, Н. С. КУПЦОВ¹, Г. Б. СМЕРНОВ¹,
Л. А. ЛЮБАСОВСКАЯ², Т. В. ПРИПУТНЕВИЧ², Е. А. ШИТИКОВ¹, Е. Н. ИЛЬИНА¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова, Москва

Variability of Recombinase Genes and Staphylococcal Cassette Chromosome *mecA* of *Staphylococcus Haemolyticus*

A. V. POLONSKAYA¹, *M. A. KORNENKO¹, A. I. MANOLOV¹, N. S. KUPTSOV¹, G. B. SMIRNOV¹,
L. A. LYUBASOVSKAYA², T. V. PRIPUTNEVICH², E. A. SHITIKOV¹, E. N. ILINA¹

¹ Federal Research & Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakova, Moscow

Коагулазо-отрицательные стафилококки (КОС), в частности *Staphylococcus haemolyticus*, играют важнейшую роль в этиологии внутрибольничных инфекций. Большинство КОС обладают устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам, которая реализуется за счёт продукции второго пенициллин-связывающего белка. Этот белок кодируется геном *mecA*, совместно с генами рекомбиназ (*ccr*), входит в состав мобильного элемента стафилококков — стафилококковой хромосомной кассеты. В ходе исследования на коллекции из 142 геномов *S. haemolyticus* проведён анализ генов *mecA* и *ccr*. Ген *mecA* был выявлен в 117 геномах (82,4%) и обладал выраженной консервативностью. На основании анализа последовательностей генов рекомбиназ установлено, что 118 образцов (83%) содержат *ccr*, причём описано 22 различных сочетания наличия гена *mecA* и генов рекомбиназ. Наиболее распространённым вариантом для *S. haemolyticus* явилось сочетание *ccrA4B4* (25%). Для оценки variability генов рекомбиназ предложены типоспецифические праймеры, работа которых была валидирована на 54 клинических изолятах.

Ключевые слова: коагулазо-отрицательные стафилококки, *S. haemolyticus*, SCCmec, устойчивость к β -лактамам антибиотикам

Coagulase-negative staphylococci (CNS), in particular *Staphylococcus haemolyticus*, play an important role in the etiology of nosocomial infections. Most CNS are resistant to beta-lactam antibiotics, which is realized through the production of the second penicillin-binding protein. This protein is encoded by the *mecA* gene and, together with the genes of recombinases (*ccr*), is part of the mobile element of staphylococci — the staphylococcal cassette chromosome. During the study, the *mecA* and *ccr* genes were analyzed using a collection of 142 genomes of *S. haemolyticus*. The *mecA* gene was detected in 117 genomes (82.4%) and had a pronounced conservation. Based on the analysis of recombinase gene sequences, it was established that 118 samples (83%) contain *ccr*, and 22 different combinations of the *mecA* and recombinase genes presence are described. The combination of *ccrA4B4* was the most common for *S. haemolyticus* (25%). Type-specific primers were proposed, to assess the variability of recombinase genes, their performance was validated on 54 clinical isolates.

Keywords: coagulase-negative staphylococci, *S. haemolyticus*, SCCmec, resistance to β -lactam antibiotics

Введение

Стафилококковая инфекция занимает одну из лидирующих позиций по частоте встречаемости в медицинской практике. При этом в последнее время наблюдается тенденция к возрастанию роли условно-патогенных коагулазо-отрицательных стафилококков (КОС), а именно *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, в развитии внутрибольничных инфекций. КОС являются возбудителями

около 30% случаев внутрибольничных инфекций кровотока, ассоциированных с использованием катетеров [1], их выявляют у 30% пациентов хирургических стационаров [2] и неонатальных отделений [3].

Препаратами выбора при лечении стафилококковых инфекций являются β -лактамы антибиотиков (БЛА) [4, 5]. Мишень их действия — участвующие в синтезе пептидогликана карбокси- и транспептидазы, известные также как пенициллин-связывающие белки (ПСБ). Связывание БЛА с ПСБ ведёт к инаktivации ферментативной активности последних, прекращению роста и после-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а. ФНЦ ФМБА

дующей гибели микробной клетки. Уровень активности конкретных БЛА в отношении отдельных микроорганизмов в первую очередь определяется аффинностью этих антибиотиков к ПСБ [6].

Повсеместное использование БЛА привело к увеличению числа микроорганизмов, устойчивых к действию этих антибиотиков. Большинство изолятов КОС (70–90%) устойчивы к метицилину и всем β -лактамам антибиотикам, тогда как у *S. aureus* таковыми являются только 20–30% изолятов [7]. Устойчивость стафилококков к этим антибиотикам обусловлена продукцией второго пенициллин-связывающего белка (PBP2a/ПСБ2a или PBP2'/ПСБ2')[8]. Белок ПСБ2a, так же как и ПСБ, относится к классу транспептидаз и участвует в синтезе пептидогликана клеточной стенки стафилококков, при этом он имеет низкую аффинность к большинству полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов, продолжая функционировать в присутствии β -лактамов антибиотиков, нивелируя их действие.

ПСБ2a кодируется геном *mecA*, входящим в состав мобильного элемента — стафилококковой хромосомной кассеты (от англ. Staphylococcal cassette chromosome elements) (*SCCmec*). Основными компонентами *SCCmec* являются *mec*-комплекс и *ccr*-комплекс, а также дополнительный регион, так называемый J-участок. *Mec*-комплекс включает ген *mecA*, интактные или поврежденные регуляторные гены *mecR1* и *mecI*, а также инсерционные последовательности IS431 и/или IS1272. *Ccr*-комплекс кодирует рекомбиназы, которые обеспечивают мобильность кассеты. Остальная часть кассеты представлена J-участками (J1, J2, J3), которые расположены по бокам и между комплексами *mec* и *ccr*, могут содержать различные гены устойчивости к тяжёлым металлам и бета-лактамам антибиотикам и псевдогены, которые не несут каких-либо значимых функций для клеток [10].

На данный момент описано три типа генов *ccr*: А, В и С. Каждый из трёх типов имеет несколько аллотипов. Считается, что если *ccr* гены обнаруживают менее 50% гомологии между собой, то они будут относиться к разным типам, а если их идентичность находится в пределах 50–85%, то к одному типу, но разным аллотипам [9].

Существуют *SCCmec*, не включающие ген *mecA* (псевдо *SCCmec*), но обладающие общими характеристиками *SCCmec*: наличием *ccr* генов (*ccrAB* или *ccrC*) и присутствием фланкирующих повторов, содержащих инсерционные последовательности [10].

Стафилококковые хромосомные кассеты активно используются для типирования стафилококков [11, 12], так как показано, что именно эта разновидность типирования наиболее подходит для исследования локальной эпидемиологии (для

оценки эпидемиологической ситуации по проблемным микроорганизмам в конкретном стационаре: определение родства микроорганизмов, установление источника инфекции, путей распространения микроорганизмов, исследования локальных вспышек).

Схема типирования *SCCmec S. aureus* заключается в определении типов *mec*-комплекса, типов и аллотипов *ccr*-комплекса при помощи амплификации со специфическими к каждому из элементов этих комплексов праймерами. На сегодняшний день описано 12 типов *SCCmec*, при этом новые типы выявляют ежегодно [13, 14].

После того, как *SCCmec* были обнаружены у других видов стафилококков, например, у гемолитического и эпидермального, ранее разработанную схему стали применять и для типирования этих видов. Проблема такого подхода заключается в том, что, как показали исследования последних лет, у КОС *SCCmec* имеет более вариабельное строение [14]. В связи с этим схема типирования, разработанная для *S. aureus*, не отражает в полной мере особенности *SCCmec* коагулозотрицательных стафилококков, в том числе *S. haemolyticus*.

В рамках данной работы проведён анализ генов *SCCmec S. haemolyticus*: установлена вариабельность гена *mecA*, выявлены основные типы рекомбиназ, а также предложена схема типирования рекомбиназ *S. haemolyticus*.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. В исследование была включена коллекция из 54 клинических изолятов *S. haemolyticus*. Образцы получены из ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» (38 изолятов), Смоленского государственного медицинского университета (НИИ Антимикробной химиотерапии) (7 изолятов) и Ульяновского государственного технического университета (9 изолятов). Чистые бактериальные культуры были выделены из клинического материала (кала, крови, мочи, ликвора, соскобов из зева, бронхоальвеолярного аспирата, отделяемого конъюнктивы, с повреждённой кожи, асцитической и плевральной жидкости, аутопсийного материала) путём пересева бактериальных клеток на питательную среду (5% кровяной агар, Oxoid). Для всех последующих манипуляций культивирование стафилококков проводили в триптон-соевом бульоне (Tryptic Soy Broth, Oxoid) при 37°C в аэробных условиях. Для видовой идентификации микроорганизмов использовали метод прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата [15].

Геномные последовательности. В работе использовали данные полногеномного секвенирования 168 образцов *S. haemolyticus*, представленных в базе данных NCBI (BioProjects: PRJEB2655 и PRJNA267549). Изоляты выделены из образцов крови человека, с раневых поверхностей, центральных венозных катетеров и др.

Кроме того, в рамках данной работы получены полногеномные последовательности трёх изолятов *S. haemolyticus* (SH527, SH39 и SH864-1) методом высокопроизводительного секвенирования на приборе IonTorrent PGM (Life Technologies, США). Для приготовления библиотек использовали набор Ion Plus Fragment Library Kit

(Lifetechnologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Аннотированные последовательности изолятов представлены в базе данных NCBI под номерами JRAW00000000, JRAY00000000 и JRAH00000000.

Для подтверждения видовой принадлежности бактериальных геномов из базы NCBI использовали модуль таксономической классификации на основании уникальных видоспецифичных маркеров MetaPhlAn [16].

Биоинформатические методы анализа полногеномных данных. Сборка коротких геномных прочтений в контиги проведена при помощи алгоритма *runAssembly* (лаборатория биоинформатики, ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили с использованием методов Parsimony и Distance программного обеспечения Seaview, version 4.6.1 [17] и Vector NTI 9.0 (Informax Inc, США).

Тип рекомбиназы определяли, сопоставляя нуклеотидные последовательности анализируемых рекомбиназ и нуклеотидные последовательности референсных рекомбиназ каждого типа (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C), представленные на информационном ресурсе <http://www.staphylococcus.net/>.

Поиск определённых генов и белков осуществляли консольными алгоритмами Prokka [18] и BLAST [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi].

Поиск однонуклеотидных полиморфизмов в гене *mecA* проводили алгоритмом VarScan [19]. В качестве референса использовался ген *mecA* *S.haemolyticus* штамма JCSC1435 (AP006716.1).

Молекулярно-генетические методы. Для выделения ДНК из бактериальных культур использовали набор «ДНК-экспресс» (ООО НПФ Литех, Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Пробы ДНК хранились при -20°C.

Детекцию гена *mecA*, а также генов рекомбиназ стафилококковой кассеты осуществляли методом амплификации соответствующих генов. Для детекции *mecA* *S.haemolyticus* использовали стандартные праймеры [<http://www.staphylococcus.net/>]. Подбор праймеров для типирования рекомбиназ *SCCmec* *S.haemolyticus* осуществляли с помощью программного обеспечения Oligo MFC Application (Molecular Biology Insights, Inc., 6.3.1.1) (табл. 1). Подобранные праймеры были протестированы с помощью виртуальной ПЦР, реализованной сервисом *ipcr* (<http://www.ebi.ac.uk/about/vertebrate-genomics/software/ipcr-manual>) на созданной базе полногеномных последовательностей. Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК

проводили модифицированным методом Сенгера с использованием ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Результаты и обсуждение

При помощи модуля MetaPhlAn проведена видовая идентификация коллекции полногеномных данных, приписанных к гемолитическому стафилококку ($n=168$), в результате которой 29 геномов были исключены из дальнейшего анализа по причине видового несоответствия и плохого качества сборки. Таким образом, была сформирована коллекция геномных последовательностей ($n=142$) *S.haemolyticus*, 3 из которых были получены в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФНКЦ ФХМ в ходе данной работы.

На основе однонуклеотидных замен в «общих» («коровых» от англ. «core» — ядро) генах для всех образцов коллекции построено филогенетическое дерево (рис. 1), иллюстрирующее высокое генетическое разнообразие среди исследуемых геномов коллекции.

Среди 142 образцов коллекции выявлено 117, содержащих ген *mecA* (рис. 1). Относительно референсного гена *mecA* штамма *S.haemolyticus* JCSC1435 было найдено 4 однонуклеотидных полиморфизма (SNP, от англ. «single nucleotide polymorphism»): a1830t (Thr610Thr), c737t (Gly246Glu), a675t (Arg225Ser), a667g (Tyr223His). Аналогичную референсному штамму аминокислотную последовательность имели 33 образца (23,2%). Восемь образцов имели 2 SNPs относительно *mecA* *S.haemolyticus* JCSC1435: c737t и a675t. По одному образцу (0,85%) имели соответственно один (c737t) и два SNPs (a667g и c737t). Последовательность *mecA* наибольшего количества образцов (73/142, 51,4%) характеризовалась одним SNP (a675t) и была гомологична последовательности штамма *S.aureus* N315 (NG_047938.1), которая является ре-

Таблица 1. Праймеры для идентификации генов рекомбиназ *SCCmec* *S.haemolyticus*

Ген	Последовательность праймеров (5'-3') (прямой/обратный)	Длина ампликона, п. о.	Температура отжига, °C
<i>ccrA1</i>	GTCAGTACAACGATATACGA GAAAGAAGTCCTGACAAGT	240	54
<i>ccrA2</i>	TCAAAATGAGTCCCAACGG TGGTTTCAATATAGGGGTA	750	54
<i>ccrA3</i>	TAAGCAATCAGGCAGAACGG GTAATTGGTAGGGTTTACG	400	56
<i>ccrA4</i>	AGCGACGAATCAAATGTCC GTTCAACGATATTGAGTGG	540	54
<i>ccrB1</i>	CACCTGTTACTTATATTCTCTC AATGGTTGGTTTGAGTGCAG	620	60
<i>ccrB2</i>	GTACAATCACATACATCTTAGC TTCATATTTTGAATACTTGGTC	632	60
<i>ccrB3</i>	ATAGTTGAAGACCTACATCGTC TTTATGATTAAGTGCCTTAGCC	336	60
<i>ccrB4</i>	GAAGTATAGACACTGGAG TTGATTCAATTCATCTTG	614	48
<i>ccrC</i>	ATTTTGAATAATCCAGTC GAAATCTCCACCAATAGG	200	50

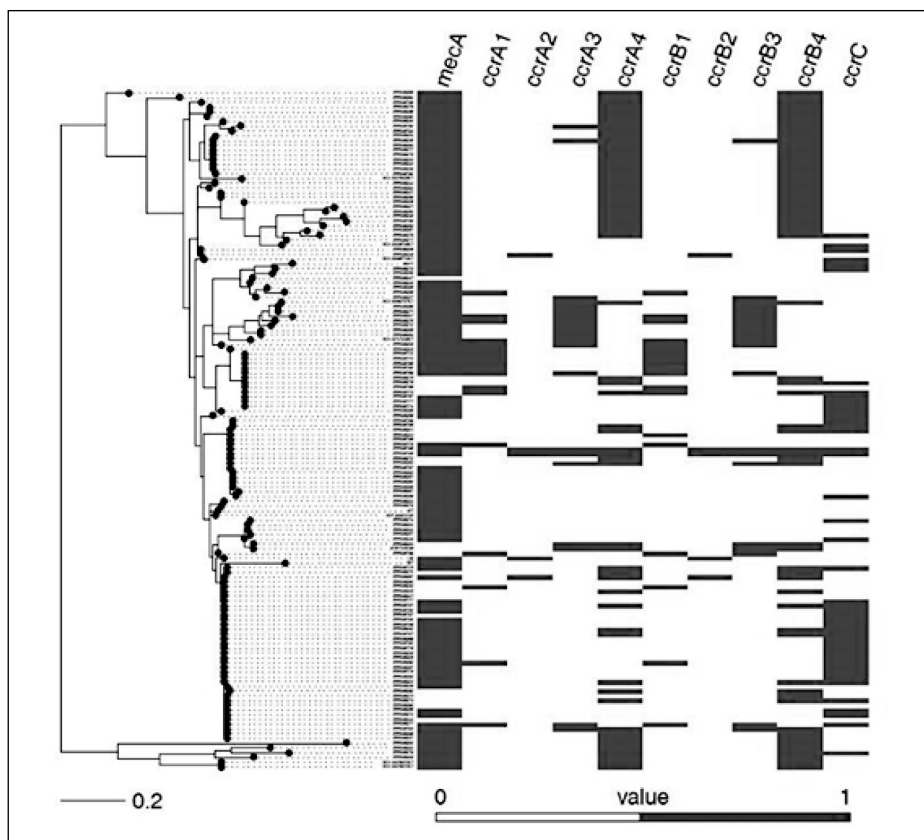


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа од-
нонуклеотидных замен всех «общих» генов для образцов коллекции и
характеристика генов *SCCmec* для них.

ференсной при анализе генетического разнообра-
зия гена *mecA* золотистого стафилококка.

В ходе анализа генов рекомбиназ было выяв-
лено, что 118 образцов из 142 содержат в составе
геномов гены кассетных рекомбиназ. Причём в

последовательности рекомбиназ золотистого
стафилококка (показаны на рис. 2 треугольни-
ками) довольно сильно отличаются от соответствую-
щих аллотипов рекомбиназ гемолитического
стафилококка (81–85% идентичности, что ниже
заявленной грани-
цы в 85%).

Что касается
рекомбиназ типа
С, то все нуклео-
тидные последо-
вательности пока-
зали идентичность
более 90% (см.
рис. 2).

На рис. 1 пока-
зан результат объе-
динения филоге-
нетического дере-
ва, построенного
на основе генов
«коровых» белков,
с наличием генов
mecA и рекомбиназ
трёх типов. В сово-
купности было вы-

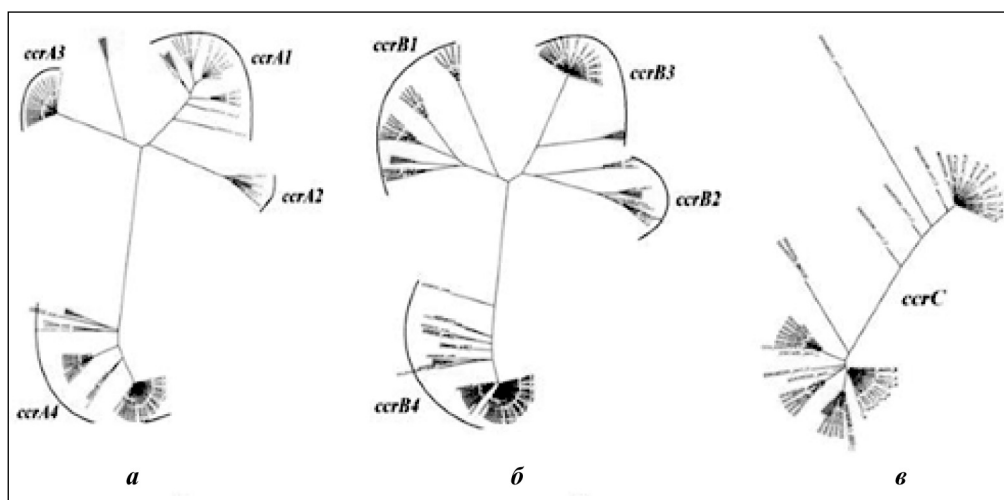


Рис. 2. Филогенетический анализ генов рекомбиназ *S. haemolyticus*.

Филогенетические деревья построены на основании множественного выравнивания
кассетных рекомбиназ.

a — рекомбиназы типа А; *б* — рекомбиназы типа В; *в* — рекомбиназа типа С.

Таблица 2. Распределение генов рекомбиназ и гена *mecA* в исследуемых выборках

Сочетание рекомбиназ и наличие гена <i>mecA</i>	Геномная коллекция (n=142)	По данным анализа результатов амплификации соответствующих генов у штаммов собранной коллекции (n=54)
<i>mecA-ccr-</i>	5	9
<i>mecA-ccrA1B1+</i>	2	
<i>mecA-ccrA1B1+ccrB3+</i>	1	
<i>mecA-ccrA1B1+ccrA4B4+ccrC+</i>	1	
<i>mecA-ccrA3B3+ccrA4B4+</i>	3	
<i>mecA-ccrA4B4</i>	5	
<i>mecA-ccrA4B4+ccrC+</i>	4	
<i>mecA-ccrB1+</i>	1	
<i>mecA-ccrB4+</i>	1	
<i>mecA-ccrC+</i>	2	4
<i>mecA+ccr-</i>	19	5
<i>mecA+ccrA1+</i>		1
<i>mecA+ccrA1B1+</i>	7	
<i>mecA+ccrA1B1+ccrA3B3+</i>	5	
<i>mecA+ccrA1B1+ccrC+</i>	1	
<i>mecA+ccrA1+ccrA4B4+</i>		4
<i>mecA+ccrA1B1+ccrA3B3+ccrC+</i>	1	
<i>mecA+ccrA2+</i>		2
<i>mecA+ccrA2B2+</i>	2	
<i>mecA+ccrA2+ccrB4+</i>		1
<i>mecA+ccrA2B2+ccrA4B4+</i>	1	
<i>mecA+ccrA2+ccrA4B4+</i>		4
<i>mecA+ccrA2B2+ccrA3B3+ccrA4B4+ccrC+</i>	2	
<i>mecA+ccrA3B3+</i>	6	
<i>mecA+ccrA3+ccrA4B4+</i>	1	
<i>mecA+ccrA3B3+ccrA4B4+</i>	3	
<i>mecA+ccrA4B4+</i>	35	16
<i>mecA+ccrA4B4+ccrA2+ccrC+</i>		1
<i>mecA+ccrA4B4+ccrC+</i>	7	5
<i>mecA+ccrB4+</i>		1
<i>mecA+ccrC+</i>	27	1

явлено 22 сочетания различных типов рекомбиназ и наличия или отсутствия гена *mecA* в исследуемых геномах (табл. 2). Наиболее представленной группой являлась группа геномов, характеризующаяся наличием гена *mecA* и генов рекомбиназ *ccrA4* и *ccrB4* (25%, 35/142 образцов). Второй по представленности была группа геномов, в состав которых входили ген *mecA*, а также ген рекомбиназы типа C (*ccrC*) (19%, 27/142 образцов). Рекомбиназы типа A и B одинаковых аллотипов обычно присутствовали в тандеме (непосредственно рядом друг с другом). Из исключений следует отметить образец ERR085183 (одновременно присутствовали рекомбиназы *ccrA3*, *ccrA4B4*), ERR085226 (*ccrA1B1*, *ccrB3*), ERR085222 (*ccrB4*) и ERR085207 (*ccrB1*).

На данный момент для типирования SCC*mec* гемолитических стафилококков используется схема, разработанная для золотистого стафилококка [http://www.staphylococcus.net/]. Праймеры, с помощью которых определяется наличие генов *mecA* и *ccr* у *S. aureus*, были протестированы с помощью виртуальной ПЦР на базе полногеномных последовательностей *S. haemolyticus*. Проверка показала, что соответствующие праймеры с высокой точностью могут детектировать наличие гена *mecA*. При этом праймеры на гены рекомбиназ показали низкую степень идентичности.

В связи с этим была разработана собственная система типирования SCC-кассеты, включающая праймеры для детекции генов рекомбиназ стафилококковой хромосомной кассеты *S. haemolyticus* (см. табл. 1).

Разработанная система типирования апробирована на коллекции клинических изолятов *S. haemolyticus* (54 изолята) (см. табл. 2). Наиболее представленным вариантом генов рекомбиназ было сочетание *ccrA4* и *ccrB4* (30%, 16/54 изолята). Одиночная рекомбиназа *ccrC* была детектирована в псевдокассетах, т. е. при отсутствии гена *mecA* (8%, 4/54) и в одном случае совместно с геном *mecA* (2%, 1/54). Рекомбиназы аллотипов *ccrA3*, *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* у штаммов коллекции обнаружены не были. Для выборочных штаммов результаты амплификации генов рекомбиназ были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру, в том числе для трёх штаммов SH527, SH39 и SH864-1, подвергнутых полногеномному секвенированию. Типы рекомбиназ, определённых для этих штаммов методом амплификации с использованием предложенных праймеров, полностью совпадали с типом рекомбиназ, полученным на основании анализа геномных последовательностей этих штаммов. Кроме того, обнаружены штаммы, несущие ген *mecA* при отсутствии генов рекомбиназ (9,2%, 5/54) (см. табл. 2).

С развитием таких направлений медицины, как хирургия, неонатология, реаниматология, а также инвазивных технологий (гемодиализ, различные катетеры, импланты), значительно возросла роль внутрибольничных инфекций, возбудителями которых часто выступают КОС. Среди КОС преобладают штаммы, устойчивые к широкому спектру антибиотиков, в том числе и метициллиноустойчивые штаммы [20]. При этом КОС отличаются широким разнообразием *SCCmec* и по всей вероятности являются резервуаром *SCCmec* для более патогенного вида стафилококков — *S.aureus* [21]. В настоящем исследовании были изучены особенности *SCCmec S.haemolyticus*, являющегося вторым по клинической значимости КОС. Кроме того, показано, что *S.haemolyticus* по сравнению с другими КОС обладают повышенной тенденцией к развитию устойчивости к антибиотикам [22, 23].

Для оценки разнообразия кассеты *S.haemolyticus* была сформирована коллекция геномных последовательностей, в которую вошли как образцы из NCBI, так и секвенированные в ходе исследования. Штаммы *S.haemolyticus*, геномы которых вошли в коллекцию, были получены из 11 различных стран, а также выделены из разных источников (крови, кала, поверхность центральных венозных катетеров), что обеспечивало представленность выборки. Кроме того, на основании филогенетического анализа «основных» генов изучаемых образцов *S.haemolyticus* (см. рис. 1) можно сделать вывод о генетическом разнообразии штаммов, вошедших в коллекцию.

В большинстве анализируемых полногеномных последовательностях был обнаружен ген *mecA* (82,4%), что подтверждает данные о высокой доле устойчивых к метицилину штаммов. При этом нуклеотидная последовательность *mecA S.haemolyticus* характеризовалась высокой консервативностью, а наибольшее количество образцов несло последовательность, идентичную последовательности аналогичного гена штамма *S.aureus* N315. Стоит отметить, что ранее описаны несколько вариантов последовательности *mecA*, обладающих гомологией на уровне 70%: *mecA1 S.sciuri* K11, *mecA2 S.vitulinus* CSBO8, *mecB Macroccoccus caselyticus*, *mecC S.aureus* LGA251 [24]. В рамках данного исследования в геномах *S.haemolyticus* представленных генов выявлено не было.

Вопросу типирования рекомбиназ *SCCmec* КОС, и в частности *S.haemolyticus*, посвящён ряд работ, что связано с высокой степенью генетического разнообразия *SCCmec* КОС. Описаны случаи, когда КОС содержат в составе своего генома более одного типа *ccr SCCmec* [25]. Было показано, что для штаммов *S.haemolyticus* наиболее часто характерны *ccrC* [26, 27, 28, 29]. Анализ коллекции

геномов показал что, наличие рекомбиназы *C* и гена *mecA* является часто встречающейся комбинацией (19%, 27/142 образцов), но в наибольшей части геномов при наличии гена *mecA* в состав *SCCmec* входят гены рекомбиназ типа *A* и *B*, относящиеся к 4 аллотипу (25%, 35/142 образцов).

Нужно отметить, что в данном исследовании были найдены штаммы *S.haemolyticus*, содержащие в своем геноме ген *mecA*, при отсутствии генов рекомбиназ *SCCmec* (13,4%, 19/142). Вероятно, это связано с наличием новых типов рекомбиназ с низкой гомологией с известными рекомбиназами. Эти данные подтверждают литературные источники, которые описывают случаи нетипируемых *SCCmec*. В некоторых исследованиях процент нетипируемых штаммов *S.haemolyticus* достигает 63,6% [26, 27, 28]. Также были установлены штаммы, в геноме которых при наличии генов рекомбиназ *SCCmec* отсутствовал ген *mecA*, т.е. штаммы с неполной (псевдо) *SCCmec* кассеты.

Полученные данные свидетельствуют о высокой вариабельности комбинации рекомбиназ, входящих в состав *SCCmec* кассеты *S.haemolyticus*, и соответственно о наличии различных типов этой кассеты. В совокупности с данными о наличии неполных (псевдо) *SCCmec*, описанный феномен косвенно свидетельствует о высокой частоте горизонтального переноса среди КОС и в частности среди *S.haemolyticus*. Кроме того, явление горизонтального переноса между штаммами *S.haemolyticus* подтверждает рис. 1. Из рис. 1 видно, что определённые типы рекомбиназ не связаны с какими-то определёнными кластерами филогенетического дерева, сформировавшихся в процессе эволюции «общих» генов.

Анализ филогенетических деревьев, построенных в пределах каждого из типов кассетных рекомбиназ (см. рис. 2) показал отличие рекомбиназ гемолитического стафилококка от рекомбиназ *S.aureus* соответствующего аллотипа (81–85% идентичности, что ниже заявленной границы в 85%). В связи с чем, для штаммов *S.haemolyticus* было осуществлено тестирование праймеров, используемых для типирования *SCCmec*. Так, праймеры на ген *mecA* с высокой точностью определяют наличие этого гена у *S.haemolyticus*, ввиду его высокой консервативности в пределах рода *Staphylococcus*. Однако праймеры на различные типы рекомбиназ не обладали достаточной гомологией с нуклеотидными последовательностями рекомбиназ *S.haemolyticus* для прохождения реакции амплификации. В связи с этим был предложен набор праймеров, подобранный непосредственно на основании сравнения нуклеотидных последовательностей рекомбиназ *S.haemolyticus*. Ещё одной причиной для создания альтернативной схемы типирования рекомбиназ *S.haemolyticus* является описание случаев нахождения штам-

мов *S.haemolyticus*, содержащих в своем геноме гены рекомбиназы А и В различных аллотипов. Таким образом, праймеры были подобраны на каждый аллотип рекомбиназ отдельно (см. табл. 1) и апробированы на коллекции штаммов (54 штамма *S.haemolyticus*) (см. табл. 2). Как и в случае анализа геномных последовательностей, наиболее распространённым сочетанием генов рекомбиназ являлось *ccrA4B4*. Что касается гена рекомбиназы *ccrC*, то он был детектирован в редких случаях, в основном в составе псевдокассет (8%, 4/54). Нуклеотидные последовательности генов рекомбиназ *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA4*, *ccrB4*, *ccrC*, установленные на основании результатов амплификации, проведённой с использованием тестируемых

праймеров, были определены и соответствовали референсным.

Выражение признательности.

Работа финансировалась грантами Российского Научного Фонда 15-15-00158 и Российским фондом фундаментальных исследований 15-04-08158. За счёт финансирования гранта 15-15-00158 была собрана коллекция *S.haemolyticus*, проведены видовая идентификация и тестирование праймеров на рекомбиназы *SCCmec*. Работа по анализу геномных последовательностей, а также полногеномное секвенирование трёх изолятов *S.haemolyticus* проведены за счёт финансирования гранта 15-04-08158.

ЛИТЕРАТУРА

- Rogers K. L., Fey P. D., Rupp M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am 2009; 23 (1): 73–98.
- Rahman A., Hosaain M.A., Mahmud C., Paul S.K., Sultana S., Haque N. et al. Species distribution of coagulase negative staphylococci isolated from different clinical specimens. Mymensingh Med J 2012; 21 (2): 195–199.
- Venkatesh M. P., Placencia F., Weisman L. E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections in the Neonate and Child: An Update. Semin Pediatr Infect Dis 2006; 17 (3): 120–127.
- Coleman K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. Curr Opin Microbiol 2011; 14 (5): 550–555.
- Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell Mol Life Sci 2004; 61 (17): 2200–2223.
- Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Бета-лактамы антибиотиков. РМЖ 1997; 21: 2.
- Malhas A.M., Lawton R., Reidy M., Nathwani D., Clift B.A. Causative organisms in revision total hip & knee arthroplasty for infection: Increasing multi-antibiotic resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* and the implications for antibiotic prophylaxis. Surgeon 2015; 13 (5): 250–255.
- Laverdière M. Trends in antibiotic resistance of staphylococci over an eight-year period: differences in the emergence of resistance between coagulase positive and coagulase-negative staphylococci. Microb Drug Resist 1998; 4 (2): 119–122.
- Rolo J., Worning P., Nielsen J.B., Bowden R., Bouchami O., Damborg P. et al. Evolutionary origin of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*). Antimicrob Agents Chemother 2017; 61 (6) pii: e02302-16.
- Shore A.C., Coleman D.C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insight. Int J Med Microbiol. 2013; 303 (6-7): 350–359.
- Романов А.В., Дехнич А.В. Типирование MRSA: какие методы являются оптимальными для решения различных задач? Клиническая Микробиология и антибактериальная химиотерапия. — 2011. — Т. 13. — № 2. — С. 168–176. / Romanov A.V., Dekhnich A.V. Tipirovanie MRSA: kakie metody yavlyayutsya optimal'nymi dlya resheniya razlichnykh zadach? Klinicheskaya Mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2011; 13 (2): 168–176. [in Russian]
- Shore A.C., Deasy E.C., Slickers P. et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2011; 55 (8): 3765–3773.
- Zhang Y., Agidi S., LeJeune J.T. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. J Appl Microbiol 2009; 107 (4): 1375–1383.
- Wu Z., Li F., Liu D., Xue H., Zhao X. Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, *CcrC2*. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59 (12): 7597–7601.
- Корниенко М. А., Ильина Е. Н., Боровская А. Д., Эдельштейн М. В., Сухорукова М. В., Кострицева М., Говорун В. М. Прямое бактериальное профилирование посредством MALDI масс-спектрометрии как метод быстрой классификации штаммов *Staphylococcus aureus*. Биомедицинская химия. — 2012. — № 5. — С. 501–513. / Kornienko M. A., Il'ina E. N., Borovskaya A. D., Edel'shtein M. V., Sukhorukova M. V., Kostriyeva M., Govorun V. M. Pryamoe bakterial'noe profilirovanie posredstvom MALDI mass-spektrometrii kak metod bystroj klassifikatsii shtamov *Staphylococcus aureus*. Biomeditsinskaya khimiya 2012; 5: 501–513. [in Russian]
- Nicola S., Levi W., Ballarini A. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. Nature Methods 2012; 9: 811–814.
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Comput Applic Biosci 1996; 12: 543–548.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 2014; 30 (14): 2068–2069.
- Koboldt D.C., Chen K., Wylie T., Larson D.E., McLellan M.D., Mardis E.R. et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. Bioinformatics 2009; 25 (17): 2283–2285.
- Diekema D.J., Pfaller M.A., Schmitz F.J., Smayevsky J., Bell J., SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32 Suppl 2: S114–132.
- Hanssen A.M., Ericson Sollid J.U. *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46: 8–20.
- Hope R., Livermore D.M., Brick G., et al. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06. J Antimicrob Chemother 2008; 62: ii65–74.
- Krediet T.G., Mascini E.M., van Rooij E., Vlooswijk J., Paauw A., Gerards L.J. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. J Clin Microbiol 2004; 42 (3): 992–995.
- Hiramatsu K., Tomasz A., de Lencastre H., Perreten V., Holden M.T., Coleman D.C. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. Ito T, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Antimicrob Agents Chemother 2012; 56 (10): 4997–4999.
- Zong Z., Peng C., Lü X. Diversity of *SCCmec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. PLoS One. 2011; 6 (5): e20191.
- Iravani Mohammad Abadi M., Moniri R., Khorshidi A., Piroozmand A., Mousavi S.G., Dastehgoli K., Mirzaei Ghazikalayeh H. Molecular Characteristics of Nasal Carriage Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci in School Students. Jundishapur J Microbiol 2015 Jun 27; 8 (6): e18591.
- Salgueiro V.C., Azevedo M.B., Iorio N.L., Amorim Ede L., dos Santos K.R. Staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a Brazilian neonatal care unit. Pediatr Infect Dis J 2014; 33 (10): 1089–1090.
- Szczuka E., Krajewska M., Lijewska D., Bosacka K., Kaznowski A. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. J Appl Genet 2016; 57 (4): 543–547.
- Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 (7): 2637–2651.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Полонская Алина Вадимовна — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Мария Андреевна Корниенко — к. б. н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Манолов Александр Иванович — к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории биоинформатики ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Никита Сергеевич Купцов — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Георгий Борисович Смирнов — д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборато-

рии молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Егор Александрович Шитиков — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Елена Николаевна Ильина — д. б. н., профессор РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Людмила Анатольевна Любасовская — к. м. н., заведующая отделением клинической фармакологии отдела микробиологии и клинической фармакологии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Татьяна Валерьевна Припутневич — д. м. н., заведующая отделом микробиологии и клинической фармакологии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Некоторые закономерности формирования персистирующих форм клинических изолятов грамотрицательных бактерий

Н. Н. МАРКЕЛОВА^{1,2}, А. В. ТУТЕЛЬЯН^{1,3,4}, В. М. ПИСАРЕВ^{1,5}, А. М. ГАПОНОВ^{1,4}

¹ Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

² Российский научный центр рентгенодиагностики МЗ РФ, Москва

³ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ, Москва

⁵ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва

Some Regularities of Persistent Forms of Clinical Isolates of Gram-Negative Bacteria Formation

N. N. MARKELOVA^{1,2}, A. V. TUTELYAN^{1,3,4}, V. M. PISAREV^{1,5}, A. M. GAPONOV^{1,4}

¹ Central Research Institute for Epidemiology, Moscow

² Central Research Institute of Roentgenology and Radiology of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

⁴ Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

⁵ Federal Research and Clinical Center of Critical Care Medicine, V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow

Исследована способность клинических изолятов *Escherichia coli* (16), *Klebsiella pneumoniae* (20), *Pseudomonas aeruginosa* (12) к выживанию при воздействии высоких бактерицидных концентраций меропенема: после 2 и 4 ч экспозиции с антибиотиком выявлены антибиотикотолерантные персистирующие формы бактерий (персистеры), представленные колониями обычных размеров и типа SCV (small variant colony). Количество выросших после антибиотической атаки колоний каждого изолята изученных видов бактерий положительно коррелировало ($p < 0,05$) со временем роста соответствующих бактериальных культур от начала лаг-фазы до момента удвоения оптической плотности в среде без антибиотика, при этом количество SCV не зависело от указанного интервала времени ($p > 0,05$). Таким образом, показано, что кинетические параметры роста бактерий в питательной среде могут характеризовать уровень образования ими персистеров в той же среде после добавления антибиотика.

Ключевые слова: антибиотикотолерантность, бактерицидные концентрации антибиотиков, кинетика роста бактерий, фенотипическая гетерогенность, варианты малых колоний.

The ability of clinical isolates *Escherichia coli* (16), *Klebsiella pneumoniae* (20), *Pseudomonas aeruginosa* (12) to survive under the influence of high bactericidal concentrations of meropenem was studied. After 2 and 4 hours of exposure to the antibiotic, the authors have identified antibiotic-tolerant populations of bacteria (persisters) represented by ordinary sized colonies and SCV type (small variant colony). The number of colonies that have grown after the antibiotic attack of each isolate of above-mentioned species of bacteria positively correlated ($P < 0.05$) with the growth time of the same bacterial cultures from the beginning of the lag-phase to the moment of doubling of the optical density in the medium without the antibiotic, while SCV number and the aforementioned time interval were not interdependent ($P > 0.05$). Thus, it has been shown that kinetic parameters of bacterial growth in a medium can designate their level of persisters formation in the same medium after the addition of an antibiotic.

Keywords: antibiotic tolerance, persistent cells, bactericidal concentrations of antibiotics, kinetics of bacterial growth, phenotypic heterogeneity, variants of small colonies.

Введение

Широкое применение антибиотиков является известным стимулом для развития антибиотикорезистентности, что делает многие инфекционные заболевания трудно поддающимися лечению. Особенно резко увеличилась в последние годы скорость формирования устойчивости к антибиоти-

кам представителями семейства *Enterobacteriaceae* и группы неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВБ) [1, 2]. Кроме того, причиной неэффективности антибиотикотерапии является образование в бактериальной популяции покоящихся клеток — персистеров, которые находятся в не-деляющемся состоянии и толерантны к антибиотикам — не погибают в их присутствии. При прекращении действия антибактериального препарата они возобновляют рост, восстанавливая популяцию, и ключевой особенностью этих клеток явля-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 111123, Москва, ул. Новогириевская, д. 3А. Центральный НИИ эпидемиологии

ется сохранение первоначальной чувствительности к антибиотикам [3—5].

В настоящее время образование персистеров описано у *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* и других видов микроорганизмов, часто восприимчивых к антибиотикам, при этом между рецидивом хронических инфекций, таких как муковисцидоз, туберкулёз и кандидоз, не поддающихся противомикробной терапии, и наличием персистеров показана прямая связь [6—10]. Они также являются важным компонентом биоплёнок, образуемых большинством бактериальных патогенов, что в значительной степени способствует их толерантности к противомикробным препаратам [7, 11].

Несмотря на активные исследования явления персистенции у различных видов бактерий, до сегодняшнего дня плохо изученными остаются не только молекулярные механизмы антибиотикотолерантности персистеров, но и закономерности их формирования в бактериальной популяции при воздействии летальных доз антибиотиков. В частности, остаются не выясненными вопросы образования персистеров в зависимости от кинетических и динамических параметров роста самих бактериальных изолятов в условиях их культивирования на питательных средах, а также существования субпопуляций в составе неоднородных популяций выживших при стрессовых воздействиях бактериальных клеток.

Цель работы — исследовать способность к образованию антибиотикотолерантных клеток у клинических изолятов грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии высоких бактерицидных концентраций меропенема и определить связь между кинетикой роста бактерий и уровнем образования персистеров.

Материал и методы

Объектами исследования служили 48 изолятов бактерий, выделенных из различного клинического материала пациентов: *Escherichia coli* ($n=16$), *Klebsiella pneumoniae* ($n=20$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=12$). Минимальные бактерицидные концентрации (МБК) антибиотиков определяли микрометодом в жидкой питательной среде Мюллера—Хинтон [12]. Об отсутствии роста бактерий в ячейках планшета судили по результатам посева инокулята на плотные питательные среды.

Культуры бактерий выращивали в бульоне Лурия—Бертани (ЛБ) в термошейкере (200 об/мин) до достижения стационарной фазы, начало которой определяли как время, когда оптическая плотность культуры не увеличивалась более, чем на 5,0% в течение 30 мин. Далее из выращенных культур в свежем бульоне ЛБ готовили суспензию плотностью 0,5 МФ ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), которую сразу же в равных объёмах добавляли в среду ЛБ, содержащую меропенем в концентрациях, превышающих МБК каждого изолята в 100 раз (0,2—3200 мкг/мл). Инокулированные в 3 повторностях образцы инкубировали 2 и 4 ч. В указанные моменты времени, антибиотик был удалён из образцов путём 3-кратного отмывания клеток 0,9% раствором хлорида натрия и центрифугирования (8000 оборотов; 10 минут). Клеточный осадок был суспендирован в

стерильном бульоне ЛБ, из которого готовили ряд последовательных разведений с 10-кратным шагом. Высев каждого разведения производили на чашки с агаром ЛБ и дополнительно на чашки с агаром Мюллера—Хинтон с антибиотиком меропенемом в той концентрации, в какой проводился эксперимент для каждого изолята (0,2—3200 мкг/мл). Это позволило исключить отбор антибиотикорезистентных мутантов. Колонии бактерий на агаре ЛБ были подсчитаны в течение 24—72 ч инкубации при 37°C. Количество КОЕ (колониеобразующих единиц) принимали соответствующим количеству выживших бактериальных клеток. В отношении выросших колоний определяли МБК меропенема, чтобы удостовериться, что их значения соответствуют исходным.

Обработку данных и статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программ Excel (США) и пакета Statistica 6 (США). Об изменениях ростовых характеристик судили по среднему квадратичному отклонению значений результатов трёх независимых экспериментов от средней арифметической. Корреляции определяли с помощью непараметрического коэффициента Спирмена для признаков, характеризующихся отличным от нормального распределения, и интервальными переменными. Результаты анализа представляли в виде критерия « p » (критического уровня значимости), различие считалось достоверным при $p < 0,05$ [13, 14].

Результаты и обсуждение

Исследуемые клинические изоляты *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, обработанные высокими концентрациями меропенема, образовывали антибиотикотолерантные популяции. Количество выживших бактериальных клеток зависело от времени действия антибиотика: через 4 ч инкубации культур с меропенемом их число уменьшилось по сравнению с двухчасовой инкубацией с меропенемом, и эти величины были связаны сильной положительной прямой связью: *E.coli* — $R = 0,97$ ($p=0,000$), *P.aeruginosa* — $R = 0,97$ ($p=0,000$), *K.pneumoniae* — $R = 0,97$ ($p=0,000$) (табл. 1—3). Полученные нами результаты не противоречат выводам многих авторов, которые указывали на зависимость гибели культур от времени воздействия сверхвысоких доз бактерицидных антибиотиков [3, 15, 16].

С другой стороны, в эксперименте мы сразу же подвергли бактериальные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, антибиотической атаке при переносе в свежую питательную среду, не дожидаясь возобновления их роста. Учитывая, что меропенем, как и все β -лактамы, эффективно убивает растущие клетки бактерий, нарушая синтез клеточной стенки, возникает предположение, что клетки стационарной фазы возобновляют рост в свежей среде независимо от нахождения в ней меропенема. Это согласуется с результатами экспериментов некоторых исследователей, которые показали, что изначальное присутствие в средах ампициллина в концентрации 100 мкг/мл не влияло на процесс пробуждения клеток *E.coli*, как и время нахождения в них антибиотика, при этом время, проведённое бактериальными клетками в свежих питательных средах, определяло количество персистеров [17]. В связи

Таблица 1. Образование персистеров *E.coli* под воздействием меропенема

МБК, мкг/мл	Время действия антибиотика						t, мин
	2 ч			4 ч			
	КОЕ всех типов		КОЕ SCV	КОЕ всех типов		КОЕ SCV	
	($x \pm \sigma$)*	V (%)		($x \pm \sigma$)*	V (%)		
0,015	1,66±0,47	28,28	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	2,33±0,47	20,2	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	0,2±0,0	0,0	<0,01	0,1±0,0	0,1	<0,01	30
0,015	2,33±0,47	20,2	<0,01	1±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	0,28±0,028	10,1	<0,01	0,1±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	0,33±0,047	14,14	<0,01	<0,1	0,0	<0,01	45
0,015	<0,1	0,0	<0,01	<0,1	0,0	<0,01	45
0,015	0,1±0,1	0,0	<0,01	<0,1	0,0	<0,01	15
0,007	0,25±0,01	6,53	<0,01	0,1±0,0	0,0	<0,01	30
0,007	1,23±0,12	10,11	<0,01	0,43±0,047	10,87	1,66±0,047	30
0,007	0,33±0,047	14,14	<0,01	0,02±0,0	0,0	<0,01	30
0,004	0,73±0,2	28,02	<0,01	0,43±0,094	21,75	<0,01	30
0,004	1,06±0,3	28,98	0,1±0,0	0,36±0,047	12,85	0,03±0,0	30
0,002	1,83±0,12	6,8	0,073±0,01	0,63±0,047	7,44	<0,01	60
0,03	<0,1	0,0	0,023±0,0047	<0,1	0,0	1,0±0,0	45
0,06	0,1±0,1	0,0	0,016±0,0047	0,1±0,1	0,0	1,0±0,0	15

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: 2 ч; 4 ч — время инкубации культур с меропенемом; t — промежуток времени от начала культивирования до удвоения оптической плотности культуры в среде, не содержащей антибиотик; * — количество КОЕ соответствует значению $(x \pm \sigma) \times 10^4$.

Таблица 2. Образование персистеров *P.aeruginosa* под воздействием меропенема

МБК, мкг/мл	Время действия антибиотика						t, мин
	2 ч			4 ч			
	КОЕ всех типов		КОЕ SCV	КОЕ всех типов		КОЕ SCV	
	($x \pm \sigma$)*	V (%)		($x \pm \sigma$)*	V (%)		
0,125	16,66±1,24	7,48	<0,01	3,33±0,47	14,14	<0,01	105
32,0	20,66±2,49	12,06	<0,01	4,66±1,24	26,72	<0,01	135
16,0	19,33±5,43	28,11	<0,01	6,66±1,24	18,7	<0,01	120
0,25	10,66±2,05	19,26	1,0±0,0	2,33±0,47	20,2	2,33±0,47	90
32,0	18,0±5,35	29,75	1,0±0,0	7,0±1,63	23,32	2,66±0,47	120
32,0	16,33±4,29	30,13	2,33±0,47	6,66±0,94	14,14	4,0±0,81	135
16,0	14,0±1,41	10,1	1,0±0,0	2,33±0,47	20,2	1,0±0,0	90
8,0	13,66±3,09	22,61	<0,01	5,33±1,24	23,75	<0,01	120
1,0	3,0±0,81	27,21	<0,01	1,66±0,47	28,28	<0,01	90
0,5	4,66±1,24	26,72	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	90
1,0	7,33±2,05	28,02	1,0±0,0	4,66±1,24	26,72	1,0±0,0	105
0,5	8,33±2,49	29,93	1,0±0,0	4,66±0,94	20,2	3,0±0,0	105

с вышеизложенным, зависимость образования персистеров от времени воздействия антибиотика, несмотря на полученную нами положительную взаимосвязь, скорее является отражением кинетических характеристик роста бактериальных культур.

Независимо от количества клеток, идентифицированных как персистеры, после удаления меропенема, которое было неодинаково у различных изолятов бактерий каждого вида, выявлена значимая корреляция между числом выживших клеток и временем, затраченным на увеличение популяции от начала лаг-фазы до момента удвоения оптической плотности культуры в среде, не содержащей антибиотик: *E.coli* — $R = 0,72$ ($t = 120$ мин; $p = 0,003$), $R = 0,64$ ($t = 240$ мин; $p = 0,025$); *K.pneumoniae* — $R = 0,73$ ($t = 120$ мин; $p = 0,000$), ($t = 240$ мин; $R = 0,74$; $p = 0,000$) и *P.aeruginosa* — $R = 0,72$ ($t = 120$ мин; $p = 0,008$), $R = 0,86$; ($t = 240$ мин; $p = 0,000$) (табл. 1—3). Прямая положительная связь между этими признаками указывает на

их взаимозависимость: чем больше времени требуется бактериальным клеткам стационарной фазы, чтобы перейти в фазу экспоненциального роста при переносе их в новую среду, тем большее количество персистеров образуется после антибиотической атаки бактерий в тех же условиях культивирования. Результаты, получаемые разными авторами при изучении образования персистеров, часто несопоставимы ввиду использования различных питательных сред, в которых одна и та же культура имеет различную кинетику роста и может производить неодинаковые количества персистеров [17—20]. В связи с этим зависимость уровня образования персистеров от кинетических параметров роста бактериальных изолятов на питательных средах можно рассматривать как одну из стабильных характеристик для описания персистирующих форм бактерий.

Изоляты каждого вида *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* отличались не только количеством выживших клеток в эксперименте с меропене-

Таблица 3. Образование персистеров *K.pneumoniae* под воздействием меропенема

МБК, мкг/мл	Время действия антибиотика						t, мин
	2 ч			4 ч			
	КОЕ всех типов		КОЕ SCV	КОЕ всех типов		КОЕ SCV	
	(x±σ)*	V (%)		(x±σ)*	V (%)		
8,0	10,66±2,49	23,38	<0,01	5±1,41	28,28	<0,01	30
8,0	8±2,16	27,00	<0,01	3,66±0,47	12,85	<0,01	30
8,0	1,0±0,0	0,0	<0,01	0,5±0,08	16,32	<0,01	30
8,0	2,33±0,47	20,2	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	30
2,0	3,33±0,47	14,14	1,0±0,0	0,83±0,12	14,96	0,43±0,094	30
0,06	5,0±1,41	28,28	<0,01	3,0±0,81	25,71	2,33±0,47	45
0,06	17,33±4,1	23,7	2,66±0,47	9,33±2,49	26,7	1,66±0,47	60
0,25	3,33±0,94	28,28	1,66±0,47	1,0±0,0	0,0	1,0±0,0	45
0,03	14,66±3,29	22,49	<0,01	7±1,63	23,32	<0,01	45
0,125	63,66±9,74	15,3	4,0±0,81	27±7,25	26,87	4,0±0,0	60
0,03	7,0±1,41	20,2	1,66±0,47	1,0±0,0	0,0	4,0±0,0	45
0,03	6,66±1,69	25,49	1,0±0,0	4,33±1,24	28,78	1,0±0,0	45
0,06	28,0±0,81	2,91	4,33±1,24	18±2,16	12,0	7,66±1,88	45
0,03	23,0±2,44	10,64	1,66±0,47	14,66±1,69	11,58	1,0±0,0	60
0,03	6,0±1,63	27,21	<0,01	1,66±0,47	28,28	<0,01	45
0,03	7,0±1,63	23,32	2,0±0,0	4,33±1,24	28,78	2,0±0,0	45
0,06	95,0±0,81	0,85	9,66±1,24	40,66±3,68	9,05	5,66±0,94	60
0,125	10,33±2,62	25,4	1,66±0,47	4,66±0,94	20,2	2,0±0,0	60
0,03	33,66±2,49	7,4	3,66±0,94	26,33±4,49	17,07	3,33±0,47	60
0,03	21±3,55	16,94	6,0±0,81	16,33±1,69	10,4	6,33±0,47	60

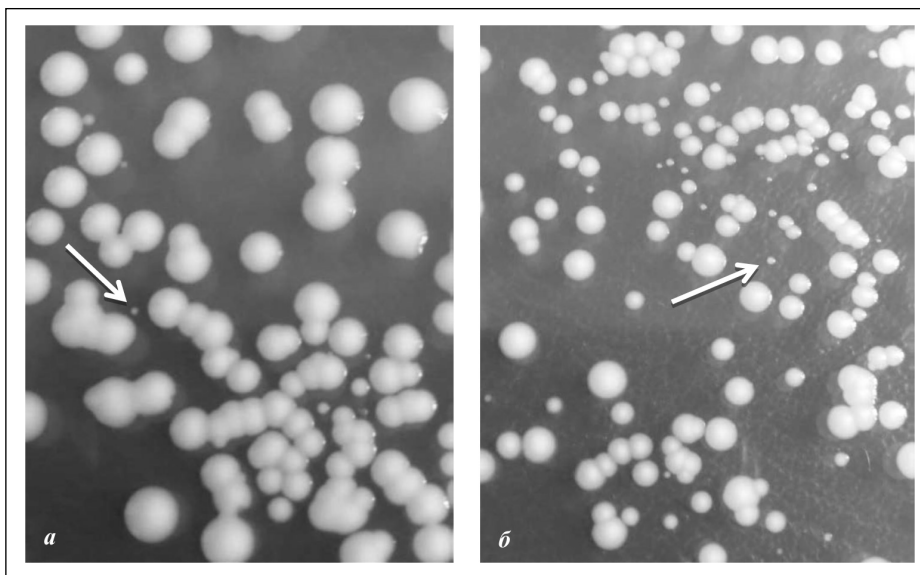
мом, но и различными значениями МБК этого препарата, при этом уровень их образования не коррелировал с МБК антибиотика в отношении: *E.coli* — $R = -0,33$ ($t = 120$ мин; $p = 0,25$), $R = -0,02$ ($t = 240$ мин; $p = 0,958$); *K.pneumoniae* — $R = -0,36$ ($t = 120$ мин; $p = 0,123$), $R = -0,36$ ($t = 240$ мин; $p = 0,123$); *P.aeruginosa* — $R = 0,57$ ($t = 120$ мин; $p = 0,054$), также как и не коррелировало значение МБК ципрофлоксацина с уровнем образования персистеров некоторыми условно-патогенными бактериями при антибиотической атаке этим препаратом в проводимых нами ранее экспериментах [21, 22]. Таким образом, различия в чувствительности бактерий к антибиотику не оказывали влияния на количество жизнеспособных клеток, восстановивших свои ростовые свойства после воздействия высоких концентраций антибактериального препарата. Исключением стал *P.aeruginosa* после 4 ч инкубации с меропенемом — $R = 0,64$ ($n = 7$; $t = 240$ мин; $p = 0,025$). Надо отметить, что МБК меропенема в отношении 50% изолятов *P.aeruginosa* составила 8,0 мкг/мл и выше, в отличие от *E.coli* и *K.pneumoniae*, рост которых в 100 и 80% случаев, соответственно, подавлялся меропенемом в концентрации менее 8,0 мкг/мл. В связи с этим требуются дополнительные исследования образования персистеров у антибиотикорезистентных к меропенему изолятов *P.aeruginosa*.

Способность бактерий выживать при стрессовых воздействиях зависит от их генетических систем, способных генерировать две или более устойчивые субпопуляции с различными фенотипическими свойствами в общей генетически однородной популяции. Фенотипические вариации могут быть эпигенетическими по своей природе,

не сопровождаться изменениями в последовательности ДНК, и зависят они от развитых разнообразных регуляторных путей, которые отвечают за различные адаптивные ответы [23].

В эксперименте кроме определения общего количества возобновивших свой рост клеток бактерий была выявлена гетерогенность их популяций, которая выражалась образованием колоний различной величины на плотной среде, так называемые варианты обычных и малых колоний — SCV (small variant colony) (рисунок). Как правило, каждому изоляту соответствовало меньшее количество SCV, чем общее число выживших клеток (табл. 1—3). Между числом SCV и временем удвоения оптической плотности культуры в среде, не содержащей антибиотик, в отличие от данных, полученных для гетерогенных популяций изолятов, корреляции не наблюдалось: *E.coli* — $R = 0,71$ ($t = 120$ мин; $p = 0,181$), $R = 0,36$ ($t = 240$ мин; $p = 0,548$); *K.pneumoniae* — $R = 0,41$ ($t = 120$ мин; $p = 0,144$), $R = 0,32$ ($t = 240$ мин; $p = 0,262$); *P.aeruginosa* — $R = 0,67$ ($t = 120$ мин; $p = 0,141$), $R = 0,71$ ($t = 240$ мин; $p = 0,109$).

Очевидно, отсутствие этой взаимосвязи связано с особенностями кинетики роста SCV, отличающейся от ростовых характеристик колоний обычных размеров — преобладающего фенотипа в изученных популяциях. В результате этих различий становится объективным то, что количество SCV после 4 ч инкубации с меропенемом сохранялось практически на том же уровне или увеличивалось по сравнению с 2 ч экспозицией с меропенемом. Вероятно, произошло запаздывание вступления SCV в фазу экспоненциального роста. Подобное явление было описано в отношении малых вариантов колоний *S.aureus*, выделенных



Варианты колоний, выживших после антибиотической атаки меропенемом: обычного размера и SCV (указаны стрелкой).

а — *K. pneumoniae*; *б* — *E. coli*.

от пациентов с муковисцидозом; SCV отличались по их фазовым характеристикам роста от нормальных колоний, в частности, увеличением времени лаг-фазы, а также уровнем экспрессии генов вирулентности, и, как следствие, сниженной вирулентностью [24]. Кроме того, есть данные, что фенотип SCV обусловлен уменьшением транспорта электронов из-за дефектов биосинтеза компонентов электронно-транспортной цепи, по отсутствию которых SCV демонстрируют ауко-трофный фенотип; и по сравнению с родительской популяцией минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков в отношении SCV характеризуются более высокими значениями [25–27]. В нашем исследовании SCV не отличались повышенной устойчивостью к меропенему относительно исходной чувствительности к нему изолятов.

Приведённые результаты исследования свидетельствуют о том, что различные изоляты микроорганизмов одного вида при культивировании в жидкой среде характеризуются закономерностями образования персистеров в зависимости от ки-

нетики роста каждой культуры в этой среде. В частности, увеличение продолжительности времени, в течение которого происходило удвоение оптической плотности бактериальных культур, статистически значимо соотносилось с количеством выживших клеток при воздействии на культуры летальными дозами меропенема различной длительности.

Число персистеров является динамической мерой конкретной культуры, отражающей скорость роста микроорганизмов в определённой питательной среде, и не является фиксированной величиной. Таким образом, различные условия культивирования

микроорганизмов в экспериментах по выявлению персистеров и их индивидуальный подсчёт могут привести к несопоставимым результатам. Необходимы точные экспериментальные детали, например, сравнение изучаемых изолятов с мутантными штаммами с изменёнными частотами образования толерантных к тем или иным антибактериальным препаратам клеток.

Неоднородность бактериальных популяций, выживших под воздействием высоких концентраций меропенема, была обусловлена присутствием колоний типа SCV, характеризующимися не только малыми размерами, но и отличными от клеток обычных размеров ростовыми характеристиками, которые могут вносить свой вклад в кинетику роста гетерогенных популяций персистеров. Кроме того, SCV представляют интерес с точки зрения адаптации бактерий к окружающим их условиям путём снижения вирулентности, замедления роста, формирования компонента биоплёнок при длительной персистенции в организме инфицированного человека

ЛИТЕРАТУРА

1. Walsh T. R., Toleman M. A. The emergence of pan-resistant gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 (Pt1): 1–3.
2. Woodford N., Turton J. F., Livermore D. M. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35 (Pt5): 736–755.
3. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 230 1s: 13–18.
4. Wooda T. K., Knabelc S. J., Kwana B. W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79 (Pt23): 7116–7121.
5. Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Писарев В.М. и соавт. Явление персистенции — формы и механизмы выживаемости популяций. *Медицинский алфавит*. — 2014. — Т. 2. — № 10. — С. 49–54. / El'-Registan G.I., Nikolaev YU.A., Mulyukin A.L., Lojko N.G., Demkina E.V., Pisarev V.M. i soavt. Yavlenie persistsentsii — formy i mekhanizmy vyzhivaemosti populyatsij. *Meditsinskij alfavit* 2014; 2: 10: 49–54. [in Russian]
6. Mulcahy L. R., Burns J. L., Lory S., Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* 2010; 192 (Pt23): 6191–6199.
7. Fleur D. L., Kumamoto C. A., Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (Pt11): 3839–3846.
8. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; 186 (Pt24): 8172–8180.
9. Fauvart M., Groote V. N. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol* 2011; 60 (Pt6): 699–709.

10. Wallis R. S., Patil S., Cheon S. H., Edmonds K., Phillips M., Perkins M. D., *et al.* Drug tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2600–06.
11. Roberts M. E., Stewart P. S. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. Microbiology 2005; 151: 75–80.
12. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04; 2004. / Gosudarstvennoe sanitarno-epidemiologicheskoe normirovanie Rossijskoj Federatsii. Metody kontrolya. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.1890-04; 2004. [in Russian]
13. Трухачёва Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica; 2012. / Trukhacheva N. V. Matematicheskaya statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s primeneniem paketa Statistica; 2012. [in Russian]
14. Яковлев В. Б. Статистика. Расчёты в Microsoft Excel. 2005. / Yakovlev V. B. Statistika. Raschety v Microsoft Excel. 2005. [in Russian]
15. Gefen O., Gabay C., Mumcuoglu M., Engel G., Balaban N. Q. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105 (Pt16): 6145–6149.
16. Balaban N. Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science 2004; 305 Is 5690: 1622–1625.
17. Jöers A., Kaldalu N., Tenson T. The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. J Bacteriol 2010; 192 (Pt13): 3379–3384.
18. Kussell E., Leibler S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. Science 2005; 309 Is 5743: 2075–2078.
19. Luidalepp H., Jöers A., Kaldalu N., Tenson T. Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. J Bacteriol 2011; 193 (Pt13): 3598–3605.
20. Tuomanen E., Durack D. T., Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30 (Pt4): 521–527.
21. Тутельян А. В., Писарев В. М., Минаева Н. З., Гапонов А. М., Грачёва А. Н., Солопова Г. Г. Генерация антибиотикотолерантных бактерий при гематологических и онкологических заболеваниях, сопровождающихся иммунокомпрометацией: новая проблема инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. — Вестник РАМН 2016. — Т. 71. — № 3. — С. 183–189. / Tutel'yan A. V., Pisarev V. M., Minaeva N. Z., Gaponov A. M., Gracheva A. N., Solopova G. G. Generatsiya antibiotikotolerantnykh bakterij pri gematologicheskikh i onkologicheskikh zabolevaniyakh, soprovozhdayushchikhsya immunokomprometatsiej: novaya problema infektsij, svyazannykh s okazaniem meditsinskoy pomoshchi. Vestnik RAMN 2016; 71 (3): 183–189. [in Russian]
22. Тутельян А. В., Гапонов А. М., Писарев В. М., Эль-Регистан Г. И. Дормантное состояние микроорганизмов и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Терапевтический архив. — 2015. — Т. 87. — № 11. — С. 103–108. / Tutel'yan A. V., Gaponov A. M., Pisarev V. M., El'-Registan G. I. Dormantnoe sostoyanie mikroorganizmov i profilaktika infektsij, svyazannykh s okazaniem meditsinskoy pomoshchi. Terapevticheskij arkhiv 2015; 87 (11): 103–108. [in Russian]
23. Smits W. K., Kuipers O. P., Veening J. W. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. Nat Rev Microbiol 2006; 4 (Pt4): 259–271.
24. Kahl B. C., Belling G., Becker P., Chatterjee I., Wardecki K., Hilgert K., *et al.* Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. Infect Immun 2005; 73 (Pt7): 4119–4126.
25. Proctor R. A., Eijff C., Kahl B. C., Becker K., McNamara P., Herrmann M. *et al.* Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nature Reviews Microbiology 2006; 4 (Pt4): 295–305.
26. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. Journal of medical microbiology 2009; 58 (Pt8): 1067–1073.
27. Proctor A., Kahl B., Eijff C., Vaudaux P. E., Lew D. P., Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. Clin Infect Dis 1998; 27 Suppl 1: S68–S74.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Маркелова Наталья Николаевна — к. б. н., с. н. с., лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Бактериолог микробиологического отдела КДЛ ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ, Москва

Тутельян Алексей Викторович — д. м. н., член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, профессор кафедры эпидемиологии ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова МЗ РФ; НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ, Москва

Писарев Владимир Митрофанович — д. м. н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов критических состояний Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского; в. н. с. лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

Гапонов Андрей Михайлович — к. м. н., заведующий лабораторией инфекционной иммунологии НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ; с. н. с. лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

Современная этиотропная терапия гриппа и ОРВИ у взрослых больных с отягощённой преморбидной патологией

*В. К. ВЕРЕВЩИКОВ¹, Е. К. ШЕМЯКИНА², А. У. САБИТОВ¹, Н. А. БАЦКАЛЕВИЧ²

¹ Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург

² Городская клиническая больница №40, Екатеринбург

Modern Etiotropic Therapy of Influenza and ARVI in Adult Patients with Premorbid Pathology

*V. K. VEREVSHCHIKOV¹, E. K. SHEMYAKINA², A. U. SABITOV¹, N. A. BATSKALEVICH²

¹ Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg

² City Clinical Hospital No.40, Ekaterinburg

Проведено открытое сравнительное наблюдательное исследование клинической эффективности и безопасности применения риамиловира (триазавиринTM) у больных гриппом и ОРВИ старше 18 лет в эпидемические сезоны 2016—2017 и 2017—2018 гг. Продemonстрирована клиническая эффективность и безопасность риамиловира (триазавиринTM) в группах больных гриппом и ОРВИ. Применение риамиловира (триазавиринTM) позволило добиться быстрой положительной динамики по купированию лихорадочно-интоксикационного и катарально-респираторного синдромов, было одинаково эффективно и при поздних сроках обращения больных за медицинской помощью.

Ключевые слова: грипп, ОРВИ, больные с отягощённой преморбидной патологией, риамилловир (триазавиринTM).

An open comparative observational study of the clinical efficacy and safety of riamilovir (TriazavirinTM) in patients over age 18 with influenza and acute respiratory viral infections (ARVIs) was conducted during the epidemic seasons of 2016—2017 and 2017—2018. Clinical efficacy and safety of riamilovir (TriazavirinTM) in groups of patients with influenza and ARVI was demonstrated. The use of riamilovir (TriazavirinTM) allowed to achieve rapid positive dynamics in the management of febrile-intoxication and catarrhal-respiratory syndromes; it was equally effective in patients who did not immediately seek professional help.

Keywords: influenza, acute respiratory viral infection, ARVI, patients with premorbid pathology, riamilovir (TriazavirinTM).

Введение

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) традиционно занимают доминирующее место в структуре инфекционной заболеваемости и обуславливают максимальные экономические потери, связанные как с непосредственными затратами на диагностику и лечение, так и упущенный доход по причине нетрудоспособности заболевших. По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в 2017 г. в России было суммарно зарегистрировано более 31,8 млн случаев острых инфекций верхних дыхательных путей (ОИВДП) и 51 тыс. случаев верифицированного гриппа [1]. Этиологическое разнообразие возбудителей ОИВДП, их антигенная изменчивость и развивающаяся со временем резистентность в значительной мере затрудняют адекватный выбор противомикробных препаратов для

проведения специфической терапии, что определяет постоянный поиск новых химических соединений для подавления активности микроорганизмов. Известно также, что наибольший лечебный эффект при ОРВИ достигается при раннем применении противовирусных средств, желательнее в первые 12—48 ч с момента появления клинических признаков, что в условиях реальной практики встречается не часто.

Дополнительными препятствиями для подбора стартовой этиотропной терапии является отсутствие массового использования методов лабораторной экспресс-диагностики в установлении вида возбудителя ОРВИ, позднее обращение заболевших за медицинской помощью и самолечение с использованием симптоматических жаропонижающих средств.

В серии доклинических исследований на клеточных культурах и биологических моделях было показано влияние нового противовирусного препарата риамиловира (триазавиринTM) в отношении вирусов гриппа типов А и В, аденовирусов, респираторно-синцитиальных вирусов, вирусов парагрипп-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 620102, г. Екатеринбург, ул. Волгоградская, 189, e-mail: kib_ugma@mail.ru

па, вируса краснухи, вируса клещевого вирусного энцефалита [2, 3], что позволило провести II и III фазы клинического изучения его активности у взрослых больных гриппом и др. ОРВИ, в том числе в сравнении с «эталонным» ингибитором нейраминидазы — осельтамивиром и ингибитором гемагглютинина — умифеновиром [2, 4–6]. Полученные в ходе исследований результаты свидетельствуют о клинической эффективности и безопасности применения риамиловира в лечении больных гриппом и ОРВИ и позволили включить его в перечень препаратов выбора при данных заболеваниях в национальные и региональные клинические рекомендации [7–10].

Вместе с тем, при проведении стандартных регистрационных клинических исследований (РКИ) принципиальным условием является тщательный отбор пациентов в группы сравнения. В качестве критериев включения в РКИ фигурируют ограничения по возрасту больных (до 60–65 лет), тяжесть течения заболевания (обычно — средней тяжести), отсутствие осложнений и отягощающих преморбидных состояний, сроки назначения противовирусной терапии с момента появления клинических симптомов (чаще — не позднее 72 ч).

Объектами нашего открытого сравнительного наблюдательного исследования стали как раз взрослые больные гриппом и ОРВИ с отягощённым преморбидным фоном и часто поздними сроками обращения за медицинской помощью. Таким образом, цель исследования — провести изучение клинической эффективности и безопасности применения риамиловира (триазаваирин™) у больных старше 18 лет с гриппом и ОРВИ, имеющих фоновую соматическую патологию и относящихся к группам риска по развитию тяжёлых и осложнённых форм заболевания.

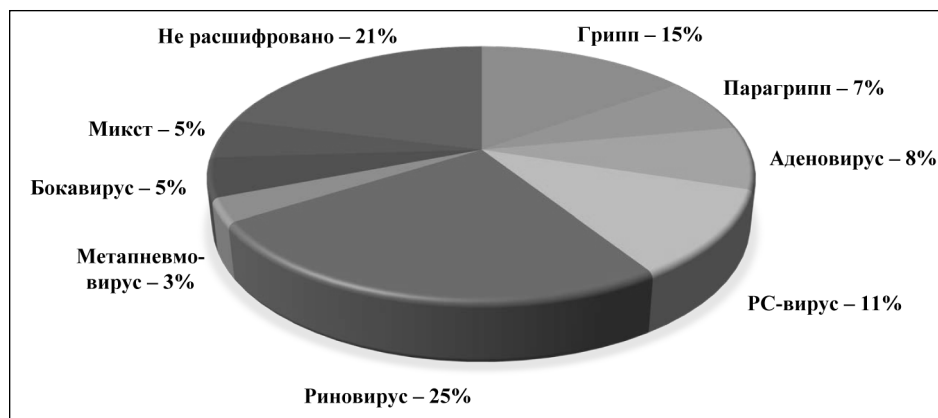


Рис. 1. Верификация диагноза гриппа и ОРВИ в исследуемой группе больных

Материал и методы

В клинике инфекционных болезней Уральского государственного медицинского университета на базе МАУ «Городская клиническая больница №40 г. Екатеринбург» проведено открытое сравнительное наблюдательное исследование клинической эффективности и безопасности применения риамиловира (триазаваирин™) у больных гриппом и ОРВИ старше 18 лет в эпидемические сезоны 2016–2017 и 2017–2018 гг. В исследование включались взрослые пациенты с клиническими признаками ОИВДП: повышение температуры не ниже 37,5°C, симптомами общей интоксикации (общая слабость, головная боль, миалгии, артралгии, гиперестезии, снижение аппетита, адинамия, чувство «разбитости», озноб/потливость), катарально-респираторным синдромом (заложенность носа, затруднение носового дыхания, насморк, боль или першение в горле, сухой кашель, аускультативные изменения в лёгочных полях, тахипноэ). Лабораторная верификация диагноза проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) мазков из носо- и ротоглотки на РНК и ДНК респираторных вирусов, взятых при поступлении больных на стационарное лечение. Результаты выделения генетического материала возбудителей ОРВИ представлены на рис. 1.

В исследование включено 160 больных (в том числе 24 — с гриппом), получавших риамиловир (триазаваирин™) по 250 мг 3 раза в сутки, и 30 больных с гриппом, принимавших осельтамивир (тамифлю™) по 75 мг 2 раза в сутки, продолжительность химиотерапии составляла 5 дней. Больные не получали другие противовирусные и иммуноориентированные препараты, включая интерфероны и индукторы их синтеза. Структура фоновой соматической патологии у наблюдаемых больных представлена в табл. 1. Возрастная характеристика больных: 18–30 лет — 18%, 31–50 лет — 34%, 51–65 лет — 23% и старше 65 лет — 25%. В соответствии с протоколом исследования отсутствовали ограничения по срокам развития первых клинических симптомов заболевания до госпитализации: на 2-е сутки бо-

Таблица 1. Структура фоновой соматической патологии у наблюдаемых больных

Сопутствующая нозологическая группа/форма	Больные гриппом, n=54		Больные ОРВИ, n=136
	при применении риамиловира, n=24	при применении осельтамивира, n=30	
Сердечно-сосудистые заболевания	18	16	59
Хроническая обструктивная болезнь лёгких	10	12	42
Бронхиальная астма	5	4	8
Хронический вирусный гепатит	6	6	15
Ожирение	4	5	21
Сахарный диабет	—	—	18
Хроническая почечная недостаточность	—	—	7

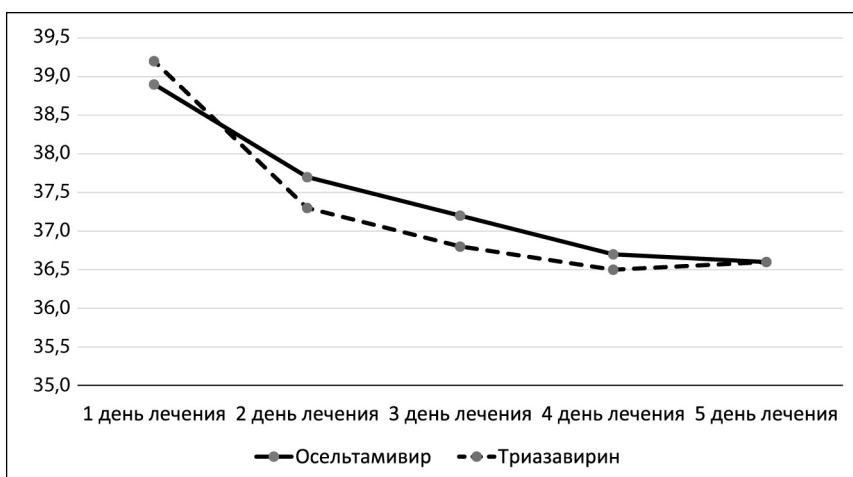


Рис. 2. Динамика температурной реакции у больных гриппом

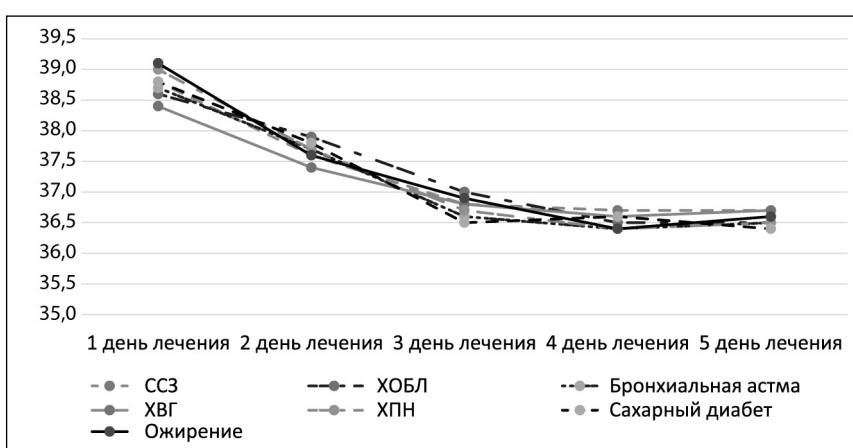


Рис. 3. Динамика температурной реакции у больных ОРВИ

лезни поступило 12 чел., на 3-и — 26 чел., на 4-е — 57 чел., на 5-е — 27 чел., на 6-е — 16 чел., на 7-е — 28 чел., на второй неделе болезни — 24 чел. Таким образом, 80% больных госпитализировано в сроки заболевания, когда эффективность противовирусной терапии заведомо считается сниженной.

Эффективность терапии оценивалась по динамике наблюдения основных клинических признаков лихорадочно-интоксикационного и катарально-респираторного синдромов в ежедневном режиме.

Статистическая обработка результатов проводилась в пакете прикладных программ Statistica 6.0. Обработка в плане описательной статистики выполнена с определением средней $\pm$ ошибки средней ($M \pm m$). Для определения значимости и достоверности различий качественных признаков между группа-

ми сравнения использовался анализ таблиц сопряженности с вычислением точного критерия χ^2 по Пирсону, χ^2 с поправкой по Йетса и точного критерия Фишера. При анализе количественных признаков при сравнении двух независимых выборок применяли критерий Манна-Уитни. При сравнении двух зависимых выборок применяли критерий Вилкоксона. Критический уровень значимости (p) принимали равным 0,05 [11].

Результаты исследований

Динамика развития клинических признаков показала преимущественно (85%) острое начало ОРВИ с повышением температуры с последующим присоединением респираторных расстройств во всех возрастных группах. Сравнительная оценка лихорадочной реакции у больных гриппом на фоне лечения риамиловиром и осельтамивиром приведена на рис. 2, что свидетельствует о стойкой нормализации температуры к 3-му дню терапии риамиловиром ($p < 0,05$). В группе больных негриппозными ОРВИ отмечена схожая положительная динамика снижения изначально фебрильной температурной реакции при применении риамиловира, причём к 3-му дню лечения субфебрильный уровень наблюдался только при наличии сопутствующих в анамнезе хронических заболеваний бронхолегочной системы (ХОБЛ, бронхиальная астма).

К 4-му дню терапии стойкая нормализация температуры была достигнута у всех больных независимо от соматического фона (рис. 3). Продолжительность наблюдения клинических симптомов периода разгара болезни у больных ОРВИ приведена в табл. 2, 3. Таким образом, проведённое исследование показало, что использование изучаемого препарата с первого дня госпитализации позволяет купировать основные клинические признаки

Таблица 2. Характеристика интоксикационного синдрома у больных ОРВИ при применении риамиловира

Сопутствующая нозологическая группа	Продолжительность клинических симптомов, дни ($M \pm m$)			
	общая слабость, адинамия, чувство «разбитости»	головная боль, миалгии, артралгии	снижение аппетита	озноб/потливость
Сердечно-сосудистые заболевания	3,0 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1
Хроническая обструктивная болезнь лёгких	3,1 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2
Бронхиальная астма	3,0 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,3
Хронический вирусный гепатит	3,2 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,3
Ожирение	3,4 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,2
Сахарный диабет	3,3 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2
Хроническая почечная недостаточность	3,1 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,3

Таблица 3. Характеристика катарально-респираторного синдрома у больных ОРВИ при применении риамилвира

Сопутствующая нозологическая группа	Продолжительность клинических симптомов, дни ($M \pm m$)			
	заложенность носа,	боль в горле	сухой кашель	аускультативные изменения в лёгких
	насморк			
Сердечно-сосудистые заболевания	4,5±0,2	4,6±0,2	5,2±0,3	5,5±0,3
Хроническая обструктивная болезнь лёгких	4,7±0,1	4,3±0,2	6,4±0,2	6,3±0,2
Бронхиальная астма	4,3±0,2	4,0±0,3	6,6±0,3	6,2±0,3
Хронический вирусный гепатит	4,4±0,2	3,9±0,1	5,4±0,2	5,3±0,3
Ожирение	4,6±0,1	4,1±0,2	5,9±0,2	5,0±0,2
Сахарный диабет	4,7±0,2	3,8±0,2	4,8±0,2	5,1±0,3
Хроническая почечная недостаточность	4,5±0,2	4,0±0,1	5,0±0,2	5,4±0,3

гриппа и ОРВИ к 5-му дню лечения, что соответствует рекомендациям по длительности этиотропной химиотерапии, изложенным в инструкции по применению [12]. Наиболее длительно сохраняющимся симптомом остаётся кашель, что обосновывает использование в комплексной терапии средств патогенетической направленности.

Нежелательных побочных явлений при использовании риамилвира у наблюдаемых больных не зарегистрировано.

Выводы

1. Применение риамилвира (триазавирин™) позволило добиться быстрой положительной динамики по купированию лихорадочно-интоксикационного и катарально-респираторного синдромов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году». — М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. — 2018. — 268 с. / Gosudarstvennyy doklad «O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2017 godu». M.: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ey i blagopoluchiya cheloveka 2018; 268. [in Russian]
2. Триазавирин — противовирусный препарат нового поколения. / Под ред. Чупахина О.Н., Киселева О.И. — Екатеринбург. — 2016. — 254 с. / Triazavirin — protivovirusnyy preparat novogo pokoleniya. / Pod red. S.Nupakhina O.N., Kiseleva O.I. Ekaterinburg. 2016; 254. [in Russian]
3. Фалынскова И.Н. и др. Оценка эффективности комбинации риамилвира и осельтамивира на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей. Антибиотики и химиотер — 2017. — Т. 62. — № 11—12. — С. 21—28. / Falynskova I.N. i dr. Otsenka effektivnosti kombinatsii riamilovira i osel'tamivira na modeli eksperimental'noy grip-poznoy infektsii myshey. Antibiotiki i khimioter 2017; 62: 11—12: 21—28. [in Russian]
4. Тихонова Е.П. и др. Изучение эффективности противовирусных препаратов (умифеновира, триазавирина) в отношении острых респираторных инфекций. Казанский медицинский журнал. — 2018. — Т. 99. — № 2. — С. 215—223. / Tikhonova E.P. i dr. Izuchenie effektivnosti protivovirusnykh preparatov (umifenovira, triazavirina) v otnoshenii ostrykh respiratornykh infektsiy. Kazanskiy meditsinskiy zhurnal 2018; 99: 2: 215—223. [in Russian]
5. Токин И.И. и др. Сравнительная клинико-экономическая оценка двух альтернативных схем противовирусной терапии больных гриппом. Журнал инфектологии. — 2018. — Т. 10. — № 2. — С. 110—116. / Tokin I.I. i dr. Sravnitel'naya kliniko-ekonomicheskaya

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Веревищев Владислав Константинович — к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург
Шемакина Евгения Константиновна — заведующим инфекционным отделением №1 МАУ ГКБ №40, Екатеринбург

2. Продemonстрирована клиническая эффективность и безопасность риамилвира (триазавирин™) в группах больных гриппом и ОРВИ, имеющих фоновую неблагоприятную соматическую патологию и относящихся к группам риска по тяжёлому и осложнённому течению болезни.

3. Применение риамилвира (триазавирин™) одинаково эффективно при поздних сроках обращения больных за медицинской помощью.

4. Рекомендуется отнести риамилвир (триазавирин™) к препаратам стартовой терапии взрослых больных с респираторными заболеваниями вирусной этиологии.

- otsenka dvukh al'ternativnykh skhem protivovirusnoy terapii bol'nykh grippom. Zhurnal infektologii 2018; 10: 2: 110—116. [in Russian]
6. Сологуб Т.В. и др. Сравнительная эффективность и безопасность применения противовирусных препаратов в терапии больных гриппом. Инфекционные болезни. — 2017. — Т. 15. — №3. — С. 25—32. / Sologub T.V. i dr. Sravnitel'naya effektivnost' i bezopasnost' primeneniya protivovirusnykh preparatov v terapii bol'nykh grippom. Infektsionnye bolezni 2017; 15: 3: 25—32. [in Russian]
7. Грипп у взрослых. Федеральные клинические рекомендации под ред. Международной ассоциации специалистов в области инфекций (МАСОИ). — М.: 2017. — 84 с. / Gripp u vzroslykh. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii pod red. Mezhdunarodnoy assotsiatsii spetsialistov v oblasti infektsiy (MASOI). M.: 2017; 84. [in Russian]
8. Грипп у взрослых. Клинические рекомендации под ред. Национального научного общества инфекционистов (ННОИ). — М.: 2017. — 76 с. / Gripp u vzroslykh. Klinicheskie rekomendatsii pod red. Natsional'nogo nauchnogo obshchestva infektsionistov (NNOI). M.: 2017; 76. [in Russian]
9. Приказ Министерства здравоохранения Свердловской области №1501-п от 01.09.2017 г. — 15 с. / Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya Sverdlovskoy oblasti №1501-p ot 01.09.2017g. — 15 s. [in Russian]
10. Приказ Министерства здравоохранения Свердловской области №1545-п от 06.09.2018г. — 14 с. / Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya Sverdlovskoy oblasti №1545-p ot 06.09.2018g. — 14 s. [in Russian]
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: 2000. — 312 с. / Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA. M.: 2000; 312. [in Russian]
12. Триазавирин: инструкция по применению. Регистрационный номер ЛП-002604. / Triazavirin: instruktsiya po primeneniyu. Registratsionnyy nomer LP-002604. [in Russian]

Сабитов Алейбай Усманович — д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней и клинической иммунологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург

Бацкалевич Наталия Александровна — к.м.н., заместитель главного врача по инфекционной службе МАУ ГКБ №40, Екатеринбург

Циклоферон в лечении иммунокомпрометированных пациентов с аллергическим ринитом

Н. С. ТАТАУРЩИКОВА

Российский Университет Дружбы Народов, Москва

Cycloferon in the Treatment of Immunocompromised Patients with Allergic Rhinitis

N. S. TATAURSHCHIKOVA

RUDN University, Moscow

Последние несколько десятилетий характеризуются появлением фенотипов аллергического ринита, воспалительный каскад которых реализуется в сложном процессе взаимодействия инфекционного и аллергического компонентов. Инфекционный компонент у лиц с аллергопатологией представлен герпес-вирусной инфекцией, часто меняющей клиническую картину у таких пациентов, объем фармакотерапии и прогноз заболевания. Наличие у иммунокомпрометированных пациентов хронической герпес-вирусной инфекции представляет эту проблему особенно актуальной, так как любая вирусная инфекция является опасной для состояния здоровья человека с аллергией. Циклоферон — эффективный и перспективный низкомолекулярный индуктор интерферона. Механизм действия циклоферона является важным звеном в выборе иммуномодулирующей терапии для лечения герпесвирусной инфекции. Представлена схема использования циклоферона у иммунокомпрометированных пациентов с аллергическим ринитом. Сочетанное применение локальной иммунотерапии и сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии (СЛИТ) данных пациентов является высокоэффективным методом.

Ключевые слова: Циклоферон, герпесвирусная инфекция, аллергический ринит, иммунокомпрометированный больной.

The last few decades are characterized by the appearance of phenotypes of allergic rhinitis, the inflammatory cascade of which is realized in a complex process of interaction of infectious and allergic components. The infectious component in people with allergopathology is a herpes-viral infection, which often changes the clinical picture in such patients, the volume of pharmacotherapy, and the prognosis of the disease. The presence of chronic herpes-viral infection in immunocompromised patients presents this problem with particular urgency, since any viral infection is dangerous for the state of human health with allergies. Cycloferon is an effective and promising low-molecular inducer of interferon. The mechanism of action of cycloferon is an important link in the selection of immunomodulatory therapy for the treatment of herpesvirus infection. The article presents a scheme of using cycloferon in immunocompromised patients with allergic rhinitis. The combined use of local immunotherapy and allergen-specific sublingual immunotherapy (SLIT) in these patients is a highly effective method.

Keywords: Cycloferon, herpes, allergic rhinitis, immunocompromised patients.

Введение

Аллергический ринит (АР) является глобальной проблемой современного здравоохранения, самым распространенным заболеванием среди всех хронических неинфекционных заболеваний. Поражая от 30 до 60 миллионов пациентов, АР встречается у 10–40% населения [1–3].

Последние несколько десятилетий характеризуются появлением фенотипов аллергического ринита, воспалительный каскад которых реализуется благодаря сложному процессу взаимодействия инфекционного и аллергического компонента. Инфекционный компонент у лиц с аллергопатологией прежде всего представлен герпес-вирусной инфекцией, зачастую полностью меня-

ющей и клиническую картину у такого пациента, и объем фармакотерапии, и прогноз заболевания. Подобное сочетание реализуется вследствие тропности слизистой оболочки носовой полости к герпес-вирусной инфекции. Изменения состояния барьерных функций слизистой у лиц с аллергией напрямую связаны с особенностями патологического процесса у таких пациентов. Наличие у иммунокомпрометированного пациента хронической герпес-вирусной инфекции делает данную проблему особенно актуальной, поскольку любая вирусная инфекция является опасной для состояния здоровья человека с аллергией. Респираторная инфекция у иммунокомпрометированного пациента с аллергическим ринитом становится предтечей первого приступа бронхиальной астмы. И, конечно же, выступает в качестве триггера обострения аллергического заболевания, вызывая прогрессирование болезни. Расце-

© Н. С. Татаурищикова, 2018

Адрес для корреспонденции: 117198 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6. РУДН.

нивая аллергический ринит, как предастму или астму лёгкой степени тяжести, нельзя не обращать внимание на чрезвычайную важность профилактики обострений аллергического ринита. Кроме того, имеются данные доказательной медицины о наличии связи между летальными обострениями астмы и респираторной вирусной инфекцией, особенно в группе иммунокомпрометированных пациентов.

Высочайшая инфицированность населения (до 90%) герпес-вирусами, пожизненная персистенция в организме человека, вследствие наличия возможности «ускользнуть» от системы иммунитета человека, переход в латентное состояние с возможностью реактивации в течение многих лет, создают почву для стойкого нарушения противовирусной защиты у пациента с АР [4, 5].

Наличие герпес-вирусной инфекции (ГВИ) у пациентов с АР приводит к ухудшению течения основного заболевания, вызывая формирование более тяжёлого воспалительного процесса на слизистых. Очевидно, что в этой когорте пациентов имеются более выраженные воспалительные изменения на слизистых, нежели у пациентов без коморбидной герпетической инфекции. Герпес-вирусы широко распространены в человеческой популяции, пантропны, способны поражать практически все органы и системы организма хозяина, вызывая латентную, острую и хроническую формы инфекции. В настоящее время известно 8 антигенных серотипов вирусов герпеса: вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типа (ВПГ-1 и ВПГ-2), ветряной оспы — опоясывающего герпеса, цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна-Барра, вирусы герпеса человека 6-, 7- и 8-го типов (ВГЧ-6, ВГЧ-7 и ВГЧ-8).

Вирус простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловирус (ЦМВ), наиболее тропные к слизистым верхних дыхательных путей, демонстрируют высокую ассоциацию с изменённым атопическим статусом и составляют серьёзную угрозу муккозальному иммунитету пациента с АР [4—7].

Одним из наиболее эффективных и перспективных низкомолекулярных индукторов интерферона является циклоферон (меглюмина акридонатацетат, метилглюкамина акридонатацетат, ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург), обладающий целым рядом фармакологических свойств (низкой токсичностью, отсутствием метаболического расщепления в печени, аллергенного, мутагенного и эмбриотоксического воздействия на организм и кумулированием в организме), которые позволили ему завоевать достойное место в ряду наиболее значимых лекарственных препаратов [8—10]. Механизмы действия циклоферона являются определяющим звеном в выборе иммуномодулирующей терапии в лечении ГВИ. Противовирусное действие препарата связано с

выработкой эндогенного интерферона, прямым воздействием на репликацию вируса, блокировкой инкорпорации вирусных ДНК или РНК в капсиды, увеличением количества дефектных вирусных частиц, снижением вирус-индуцированного синтеза белков в клетках. Чрезвычайно важными в рациональной терапии ГВИ являются и данные о том, что циклоферон подавляет размножение вирусов герпеса простого 1 и 2 типов (ВПГ-1 и ВПГ-2), цитомегаловируса (ЦМВ) в клеточных культурах и увеличивает «выживаемость» и среднюю продолжительность жизни экспериментальных животных при летальной вирусной инфекции. Циклоферон начинает индуцировать ранний IFN через 4—8 ч, пик достигается на 8 ч, постепенно снижаясь к 24 ч (от момента введения препарата) и полностью исчезает после 48 ч. В тканях и органах, содержащих лимфоидные элементы, интерферон, индуцирующийся под влиянием циклоферона, сохраняется в течение 72 ч, активность интерферона в плазме или сыворотке крови человека тесно связана с концентрацией циклоферона. Препарат способствует восстановлению Т-клеточного звена иммунитета: нормализует уровни субпопуляций CD3+, CD4+, а также количество CD16+ (естественных киллеров), CD8+, CD72+ «Т-лимфоцитов». Неоспоримым достоинством циклоферона является его полифункциональность, сочетание широкого спектра фармакологических эффектов — что позволяет рассматривать препарат в качестве средства профилактики и лечения детей, больных со сниженным иммунитетом и с сопутствующей хронической соматической патологией, пожилых и престарелых больных. Обоснованность и эффективность использования препарата у иммунокомпрометированных пациентов с аллергическим ринитом показана в ряде исследований [9—14], и включает следующие варианты:

1. Профилактическая схема применения циклоферона:

Используется с целью предупреждения острых респираторных инфекций и обострений АР.

В период эпидемических вспышек респираторных инфекций рекомендуется профилактический приём циклоферона у иммунокомпрометированных больных АР с целью предупреждения острых респираторных инфекций и обострений заболевания: таблетки 150 мг перорально по 0,3 г 1 раз в день на 1-, 2-, 4-, 6-, 8-, 11-, 14-, 17-, 20-е и 23-и сутки на курс 20 таблеток.

Литературные данные подтверждают эффективность данной схемы. Отмечено снижение заболеваемости ОРЗ и частоты обострений в течение года у пациентов, получавших препарат, в среднем в 2,5 раза [15].

2. Использование Циклоферона у иммунокомпрометированных больных с обострениями АР фоне

ОРЗ для лечения ОРЗ и профилактики бронхиальной астмы

Наличие вирусной инфекции (вирусы гриппа А и В, РС-вирус, аденовирус, вирусы парагриппа 1 и 3 типа), связывают с дебютами и обострением бронхиальной астмы у 73,6% пациентов. Подавляющее большинство обострений атопической бронхиальной астмы было ассоциировано с микст-инфекциями (73,7%) — вирусно-микоплазменными (63,2%), — вирусно-вирусными (10,5%). [16]. У иммунокомпрометированных больных с АР на фоне острых респираторных заболеваний без/или с обострениями бронхиальной астмы, в том числе осложнённых бактериальной инфекцией, рекомендуется использование циклоферона по схеме 125 мг/мл в/м по 2 мл 1 раз в день ежедневно в течение 10 дней. Эффективность данной схемы подтверждена литературными данными [16], демонстрирующими снижение потребности в фармакотерапии ОРЗ, в том числе потребности в антибиотикотерапии, снижении риска и продолжительности госпитализаций.

3. Использование локальной иммунотерапии с применением циклоферона у иммунокомпрометированных больных с АР с/без бронхиальной астмы

Метод состоит во введении раствора циклоферона 125 мг/мл в разведении физиологическим раствором в соотношении 2:1 (2 мл циклоферона + 1 мл физиологического раствора) на слизистую оболочку носа через небулайзер [12] или нанесении линимента Циклоферона тонким слоем на слизистую оболочку преддверия носовой полости 2 раза в сутки на протяжении 15-ти дней. В данном случае курсовое лечение рекомендуется проводить несколько раз в год: в осенне-зимний период и в период паллиации или обострения вместе с базовой противовоспалительной терапией. Использование препарата в

виде раствора 125 мг/мл является одинаково эффективным для коррекции проявлений «инфекционного» синдрома как при внутримышечном, так и при ингаляционном пути введения. Однако отмечается большая эффективность в воздействии на параметры «аллергического синдрома», то есть активности основного процесса после проведенной локальной иммунотерапии.

4. Циклоферон в схемах АСИТ у иммунокомпрометированных пациентов с АР

Перспективным является использование циклоферона в схемах аллерген-специфической иммунотерапии у лиц с АР. Целью комплексного применения циклоферона в схеме АСИТ является расширение показаний для АСИТ и повышение эффективности метода у иммунокомпрометированных больных (с аллергопатологией и ГВИ). При использовании циклоферона в комплексе с АСИТ, речь идёт не о заместительной терапии, а о форсификации каскада иммунных реакций в ходе АСИТ [12, 17]. Метод состоит во введении раствора циклоферона 125 мг/мл в разведении физиологическим раствором в соотношении 2:1 (2 мл циклоферона + 1 мл физиологического раствора) на слизистую оболочку носа через небулайзер. Показаниями для использования метода является наличие ВААР, т. е. АР у иммунокомпрометированного пациента. Ингаляции проводятся через день на фоне проведения АСИТ. На курс рекомендуется 10 процедур, суммарная доза циклоферона на курс 1250 мг.

Таким образом, понимание принципов и эффективное использование рациональной фармакотерапии АР у иммунокомпрометированных пациентов позволяет максимально успешно лечить патологию, и создаёт предпосылки для формирования стратегически правильных лечебных тактик в ведении пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rondon C., Fernandez J., Canto G., Blanca M. Local Allergic rhinitis. Concept, clinical manifestations, and diagnostic approach. J Investing Allergol Clin Immunol 2010; 20 (5): 364—371.
2. Papadopoulos N.G., Bernstein J.A., Demoly P., Dykewicz M., Fokkens W., Hellings P.W., Peters A.T., Rondon C., Togias A., Cox L.S. Phenotypes and endotypes of rhinitis and their impact on management: A PRAC-TALL report. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2015; 70: 1: 474—494.
3. Global atlas of allergy. Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology / Cezmi A. Akdis. Ioana Agache. Ed. 2014; 178—180.
4. Нестерова И.В., Ковалёва С.В., Клещенко Е.И., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтаидзе Л.В., Шинкарева О.Н. Модифицированная программа комбинированной интерферон- и иммунотерапии при ассоциированных респираторных и герпетических вирусных инфекциях у иммунокомпрометированных детей. Эффективная фармакотерапия. Аллергология и иммунология. — 2013. — Т. 27. — № 1. — С. 26—32. / Nesterova I.V., Kovalyova S.V., Kleschenko E.I., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Shinkareva O.N. A modified program of combined interferon and immunotherapy with associated respiratory and herpetic viral infections in immunocompromised children Effective pharmacotherapy. Allergology and Immunology 2013; 1: 26—32. [in Russian]
5. Бокова Т.А. Герпесвирусные инфекции у детей современные возможности терапии Лечащий врач. — 2015. — № 6. — С. 37—40. / Bokova T.A. Herpesviral infections of patients with modern possibilities of therapy Attending physician 2015; 6: 37—40. [In Russian]

6. Татаурщикова Н.С., Дегтярева Е.А., Краснов В.В., Романцов М.Г. Иммунокомпрометированный больной. Практические рекомендации. — 2009. — С. 48. / Tataurshchikova N.S., Degtyareva E.A., Krasnov V.V., Romantsov M.G. Immunocompromised patient Practical recommendations 2009; 48. [in Russian]
7. Igde M., Igde F. A., Yazici Z. Herpes Simplex Type 1 Infection and Atopy Association in Turkish Children with Asthma and Allergic Rhinitis Iran J Allergy Asthma Immunol September 2009; 8 (3): 149—154. [in Russian]
8. Циклоферон в клинической практике: Методические рекомендации для врачей / Под ред. проф. В. А. Исаков. СПб.: 2002. — 48 с. / Cycloferon in clinical practice: Methodological recommendations for doctors / Pod red. prof. V.A. Isakov. SPb.: 2002; 48. [in Russian]
9. Татаурщикова Н.С., Сепиашвили Р.И. Современные подходы к использованию иммуномодуляторов в аллергологической практике. Учебно-методическое пособие. М.: 2012. — 40 с. / Tataurshchikova N.S., Sepiashvili R.I. Modern Approaches to the Use of Immunomodulators in Allergological Practice, Teaching aid. M.: 2012; 40. [in Russian]
10. Татаурщикова Н.С., Сепиашвили Р.И. Современные подходы к использованию иммуномодуляторов в аллергологической практике. Учебно-методическое пособие. М.: 2012. — 40 с. / Tataurshchikova N.S., Sepiashvili R.I. Modern Approaches to the Use of Immunomodulators in Allergological Practice, Teaching aid. M.: 2012; 40. [in Russian]
11. Татаурщикова Н.С. Циклоферон в клинической аллергологии. СПб.: 2010. — 46 с. / Tataurshchikova N.S. Cycloferon in clinical allergology, SPb.: 2010; 46. [in Russian]

12. *Татаурищикова Н.С., Сидорович И.Г.* Новое в локальной иммунотерапии аллергического риносинусита — интраназальная аэрозоль-терапия раствором циклоферона. Вестник оториноларингологии. — 2012. — № 2. — С. 49—53. / *Tataurshchikova N.S., Sidorovich I.G.* New in local immunotherapy of allergic rhinosinusitis — intranasal aerosol therapy with cycloferon solution. Bulletin of Otorhinolaryngology 2012; 2: 49—53. [in Russian]
13. *Татаурищикова Н.С., Сангидорж Б.* Инновационные подходы в лечении вирус-ассоциированного аллергического ринита. Вестник последилового медицинского образования РУДН. — 2015. — № 4. — С. 64—65. / *Tataurshchikova N.S., Sangidorj B.* Innovative approaches in the treatment of virus-associated allergic rhinitis. Vestnik postgraduate medical education PFUR, M.: 2015; 4: 64—65. [in Russian]
14. *Tataurshchikova N., Sangidorj B., Ronzhina A.N.* Virus — associated allergic rhinitis as a phenotype and its' clinic — immunological specifics. World Allergy Organization Journal, 2017 в печати.
15. *Романцов М.Г., Селькова Е.П., Гаращенко М.В., Семенов Т.А., Шульдяков А.А., Кондратьева Е.И., Тютеева Е.Ю., Коваленко А.Л.* Повышение естественной резистентности детей с целью профилактики гриппа и ОРВИ (результаты многоцентровых рандомизированных исследований). Антибиотики и химиотерапия 2009. — Т. 54. — № 9—10. / *Romantsov M.G., Selkova E.P., Garashchenko M.V., Semenenko T.A., Shuldyakov A.A., Kondratieva E.I., Tyuteva E.Yu., Kovalenko A.L.* Increase in the natural resistance of children for the prevention of influenza and ARVI (results of multicenter randomized trials). Antibiotiki i khimioter 2009; 54: 9—10. [in Russian]
16. Бронхиальная астма: терапия при острых респираторных инфекциях. Применение меглюмина акридонацетата в комплексной терапии бронхиальной астмы при острых респираторных инфекциях» Метод. рекомендации / Под редакцией А.Г.Чучалина, Ф.И.Ершова, 2012. / *Bronchial asthma: therapy for acute respiratory infections. The use of meglumine acridone acetate in the complex therapy of bronchial asthma in acute respiratory infections. Method. Recommendations edited by Chuchalin A.G., Ershova F.I., 2012.* [in Russian]
17. *Романцов М.Г., Ершов Ф.И.* Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях: Руководство для врачей. — М.: Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2007. — 363 с. / *Romantsov M.G., Ershov F.I.* Medicines used in viral diseases: A guide for doctors. M.: Publishing group «GEOTAR-Media», 2007; 363. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Татаурищикова Наталья Станиславовна (Tataurshchikova Natalia Stanislavovna) — д. м. н., профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПКМР РУДН, зам. декана ФПКМР Российского Университета Дружбы Народов, Москва

Анкетирование врачей для определения исходного уровня знаний как механизм повышения эффективности образовательных мероприятий в области рациональной антимикробной терапии

О. Г. НИ¹, И. Н. ОЧАКОВСКАЯ^{1,2}, Н. Е. ШАБАНОВА^{1,2}, Г. А. ПЕНЖОЯН^{1,2}, Г. Ю. МОДЕЛЬ¹, С. В. ЯКОВЛЕВ³

¹ Краевая клиническая больница №2, Краснодар

² Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар

³ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Survey of Physicians to Assess the Initial Level of Knowledge as a Mechanism for Increasing the Efficiency of Educational Programs in the Field of Rational Antimicrobial Therapy

O. G. NI¹, I. N. OCHAKOVSKAYA^{1,2}, N. E. SHABANOVA^{1,2}, G. A. PENZHOYAN^{1,2}, G. YU. MODEL^{1,2}, S. V. YAKOVLEV³

¹ Regional Clinical Hospital No. 2, Krasnodar

² Kuban State Medical University, Krasnodar

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Одной из причин неуспеха образовательных мероприятий в области рациональной антимикробной терапии, вероятно, является несоответствие между уровнем исходной подготовки слушателей и сложностью представляемого материала. Целью данного исследования являлась оценка исходного уровня знаний врачей в области микробиологии, клинической фармакологии антимикробных препаратов и уровня антибиотикорезистентности в ЛПУ для разработки эффективной программы обучения. *Материалы и методы.* Настоящее исследование проведено в рамках реализации I этапа программы СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) в стационаре. Мы провели анонимное анкетирование врачей разных специальностей по составленной врачами-клиническими фармакологами анкете, которая включала вопросы разного уровня сложности, разделённые на тематические блоки. Результаты анкетирования оценивали и сравнивали в зависимости от специальности и стажа, а также анализировали, насколько ожидаемый исследователями уровень знаний респондентов соответствует фактическому. *Результаты.* Было проанкетировано 110 врачей различных специальностей. Респонденты показали низкий уровень знаний в исследуемой области (в среднем доля верных ответов составила 50%), причём результаты анкетирования достоверно зависели от специальности. Также была выявлена зависимость результатов от стажа, с постепенным накоплением знаний в первые 15 лет врачебной практики и тенденцией к снижению числа правильных ответов у специалистов с большим опытом профессиональной деятельности. Прогнозируемая экспертами сложность вопросов в 66% случаев не совпала с фактической, причём в 96% случаев несовпадений фактическая сложность была выше прогнозируемой. *Заключение.* Результаты исследования показали, что при подготовке образовательных мероприятий экспертам необходимо более объективно оценивать исходный уровень знаний слушателей, делая изложение материала максимально доступным и интересным для аудитории. Также может быть целесообразно разрабатывать различные программы обучения для врачей разных специальностей. Основной упор необходимо делать на обучении молодых докторов, по возможности ненавязчиво вовлекая в процесс врачей с большим клиническим опытом. Немногочисленная группа респондентов и участие в опросе только одного центра не позволяет делать обобщающие заключения.

Ключевые слова: анкетирование, уровень знаний, рациональная антимикробная терапия, клиническая микробиология, микробная резистентность, программа СКАТ.

One of the reasons of the failure of educational activities in the field of rational antimicrobial therapy is, most likely, the discrepancy between the level of initial training of students and the complexity of the presented material. The aim of this study was to assess the baseline knowledge of physicians in the field of microbiology, clinical pharmacology of antimicrobial agents and the level of antibiotic resistance in health facilities to develop an effective training program. *Materials and methods.* The study was conducted in the framework of implementation of the first phase of the antimicrobial stewardship program — SCAT program (Strategy for the Control of Antimicrobial Therapy). An anonymous survey of physicians of different specialties was carried out. Clinical pharmacologists composed the questionnaire, which included questions of different levels of complexity, divided into thematic blocks. The results of the survey were evaluated and compared depending on specialty and experience. The expected and real level of knowledge was analyzed. *Results.* 110 doctors of different specialties have participated in the survey. The respondents showed a low level of knowledge in the scope of the inquiry (50% correct answers on average), survey results significantly depended on specialty. The correlation between results and experience was also revealed — the knowledge was accumulated in the first 15 years of experience, while the number of correct answers among specialists with more extensive profes-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 350012 Краснодар, ул. Красных Партизан, 6/2. Краевая клиническая больница № 2

sional experience had a tendency to decrease. The complexity of the questions predicted by the experts did not correspond with the actual one in 66% of the cases. In 96% of inconsistencies, the real complexity was higher than the predicted one. **Conclusion.** The results of the study revealed that experts should assess the baseline level of knowledge of specialists more objectively. The training course should be as understandable and interesting for the audience as possible. It may also be advisable to develop various training programs for doctors of different specialties. The main emphasis should be placed on the training of young doctors, unobtrusively involving doctors with greater clinical experience in the process, if possible. The small group of respondents and only one center that participated in the survey do not allow making generalizing conclusions.

Keywords: questioning, level of knowledge, rational antimicrobial therapy, clinical microbiology, microbial resistance, antimicrobial stewardship.

Введение

Обучение врачей рациональному применению лекарственных средств является неотъемлемой частью работы врача-клинического фармаколога в любом лечебном учреждении [1]. И, наверное, ни одна область фармакотерапии не нуждается в рационализации и оптимизации больше, чем антимикробные препараты (АМП). Ведь не зря же резистентность микроорганизмов к антибиотикам признана проблемой не только здравоохранения, но и общества в целом.

Одним из способов решения этой проблемы считается переход к более рациональному применению антимикробных препаратов и отказ от необоснованного их назначения. Такой комплекс мероприятий, направленных на сокращения нерационального применения АМП в стационаре, в России известен как программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии), а в других странах — как Antimicrobial Stewardship. Этот путь может основываться только на осознанном решении каждого лечащего врача и требует глубоких знаний микробиологии и клинической фармакологии антибиотиков. Административные меры в этой ситуации малоэффективны.

Однако любой клинический фармаколог, который пытался организовать и провести обучение по рациональной антимикробной терапии, наверняка в той или иной степени сталкивался с отсутствием интереса, а иногда и с негативным отношением врачей к такого рода мероприятиям. Одной из причин такого неуспеха, вероятно, является несоответствие между уровнем исходной подготовки врачей и сложностью представляемого материала.

Цель исследования — оценка исходного уровня знаний врачей в области микробиологии, клинической фармакологии АМП и уровня антибиотикорезистентности в ЛПУ для разработки максимально эффективной программы обучения.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить результаты анкетирования врачей разных специальностей.
2. Оценить влияние стажа работы врача на уровень знаний в исследуемой области.
3. Сопоставить уровень знаний, ожидаемый экспертами, и фактический.

4. С учётом выявленных наиболее проблемных вопросов для врачей каждой специальности разработать план обучения по специальностям.

Материал и методы

Настоящее исследование проведено в рамках реализации I этапа программа СКАТ в стационаре. Мы проводили анонимное анкетирование врачей разных специальностей ГБУЗ «ККБ №2» г. Краснодара по опроснику (анкете), составленному врачами-клиническими фармакологами больницы. Анкета включала 36 вопросов разного уровня сложности. К каждому вопросу предлагалось пять или шесть вариантов ответов, из которых необходимо было выбрать один верный. Анкета состояла из нескольких тематических блоков (табл. 1). Время, отведённое на ответы, не лимитировалось. Кроме того, участникам анкетирования предлагалось отметить год получения диплома.

Вопросы по клинической фармакологии АМП были составлены на основании актуальных на момент создания анкеты инструкций по медицинскому применению препаратов [2]. При формулировании верных ответов в остальных разделах авторы брали за основу руководство по антимикробной терапии «Рациональная антимикробная фармакотерапия. Руководство для практикующих врачей» [3].

Результаты анкетирования оценивали в процентах (доля правильно отвеченных вопросов). Кроме того, оценивали влияние специальности и стажа на результаты анкетирования. Стаж определялся как количество лет, прошедших после получения диплома. Статистический анализ результатов проводили с помощью программ «BIOSTAT» «STATISTICA 6,0 for Windows» фирмы «StatSoftInc». В качестве порогового уровня статистической значимости было принято значение $p=0,05$.

Результаты и обсуждение

В анкетировании приняли участие 110 врачей разных специальностей, которые были представлены четырьмя группами: 24 неонатолога (1-я группа), 26 врачей хирургических специальностей (2-я группа), 48 акушеров-гинекологов (3-я группа) и 12 врачей-реаниматологов (4-я группа). Год получения диплома отметили 67 респондентов из 1-й, 3-й и 4-й групп, врачи хирургических специальностей год окончания ВУЗа не отмечали.

Уровень ответов оказался весьма неоднородным, самый лучший результат составил 86% правильных ответов, самый худший — 17%, средний балл — 50%. Интересно, что лучший средний результат по специальности показали акушеры-гинекологи (средний балл 58%), а худший — реаниматологи (44%), у врачей хирургических специальностей и неонатологов средний балл составил 48%. При этом и анкета с лучшим результатом, и

Таблица 1. Тематическая структура опросника

Тема	Количество вопросов
Общие вопросы клинической микробиологии	6
Спектр активности антимикробных препаратов	10
Безопасность антимикробных препаратов	7
Общие вопросы антибиотикорезистентности	6
Данные локального микробиологического мониторинга	7

Таблица 2. Распределение доли правильных ответов по темам (%)

Тема	Специальности врачей				
	акушеры-гинекологи	хирурги	неонатологи	реаниматологи	средний балл по теме
№1. Общие вопросы клинической микробиологии	64	53	56	46	55
№2. Спектр активности антимикробных препаратов	55	50	54	60	55
№3. Безопасность антимикробных препаратов	56	46	40	42	46
№4. Общие вопросы антибиотикорезистентности	76	50	55	42	56
№5. Данные локального микробиологического мониторинга	43	32	36	21	33
Средний балл по специальности	58	48	48	44	

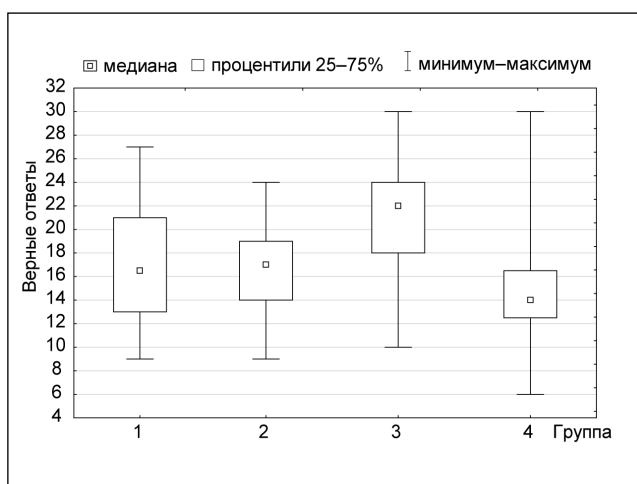


Рис. 1. Результаты анкетирования в зависимости от специальности.

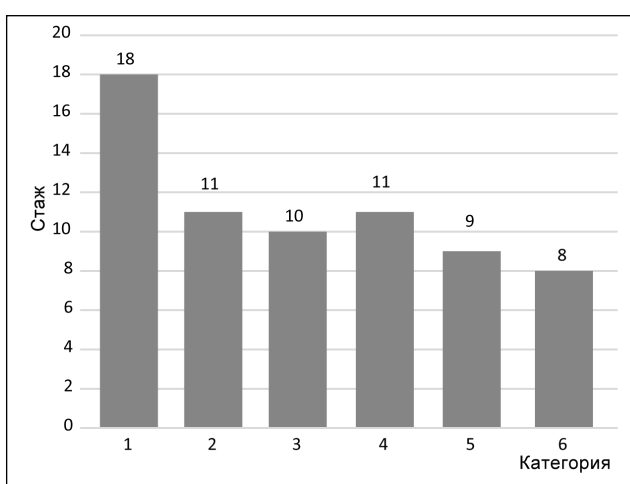


Рис. 2. Распределение респондентов в зависимости от стажа.

анкета с худшим результатом принадлежат врачам-реаниматологам.

Распределение доли правильных ответов по темам и специальностям показано в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что хуже всего врачи информированы о данных локального микробиологического мониторинга, практически никто не имеет полного представления о структуре микробного пейзажа в своих отделениях и уровне резистентности основных патогенов. По другим темам средний процент правильных ответов был сопоставим, хотя прослеживались отличия в зависимости от специальности. Можно заключить, что средний уровень знаний респондентов невысок. Если говорить о стандартных критериях оценки тестовых заданий в высших учебных заведениях, то для получения удовлетворительной оценки необходимо набрать не менее 60% правильных ответов. Этой отметки достигли лишь 44% респондентов. Таким образом, у большинства врачей уровень знаний по антимикробной терапии неудовлетворительный.

Для проверки гипотезы о различном уровне знаний врачей разных специальностей был использован непараметрический тест Крускала-Уоллиса, в силу того, что результаты опроса были представлены в виде данных, не имеющих нормальное распределение. Его значение составило $H=21,47105$, $p=0,0001$, что свидетельствует о достоверно значимом различии между группами. Графически результат теста отображен на рис. 1.

По стажу опрошенные были разделены на шесть категорий (рис. 2): от 0 до 5 лет (категория 1), 6 — 10 лет (категория 2), 11 — 15 лет (категория 3), 16 — 20 лет (категория 4), 20 — 30 лет (категория 5) и более 30 лет (категория 6).

Для проверки гипотезы зависимости между стажем врача и уровнем знаний использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). На рис. 3 представлен график зависимости стажа и результатов анкетирования, $p=0,014$. Мы видим, что в начале самостоятельной деятельности есть определённый уровень знаний по исследуемой теме, по мере осуществления практической деятель-

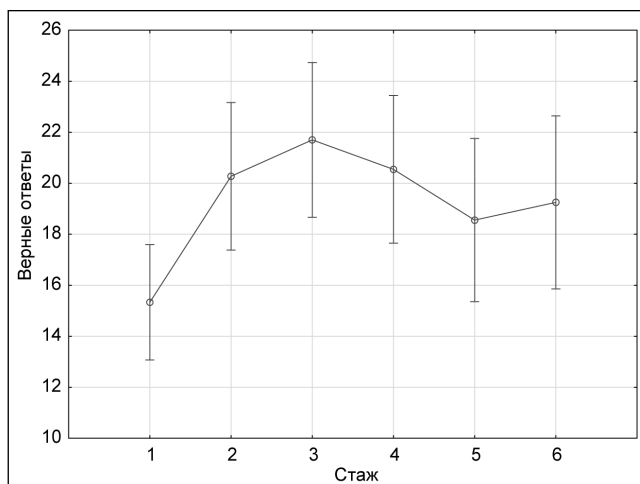


Рис. 3. Результаты анкетирования в зависимости от стажа.

ности и накопления опыта он постепенно повышается, достигая максимума к пятнадцатилетнему периоду. Затем наступает некоторое снижение уровня знаний в области клинической микробиологии и рационального применения АМП.

Также для каждого вопроса оценивалась его прогнозируемая и фактическая сложность. До начала анкетирования группе экспертов, состоящей из врачей-клинических фармакологов (4 человека) и врачей-микробиологов (7 человек), предлагалось определить, насколько сложными для врачей будут вопросы анкеты. Для этого каждый из экспертов присваивал каждому ответу балл от 1 (лёгкий вопрос) до 3 (очень сложный вопрос). Далее для каждого вопроса высчитывался средний балл — прогнозируемая сложность вопросов. Затем по результатам анкетирования оценивалась фактическая сложность. Вопросам, на которые не менее 85% респондентов ответили правильно, присваивался 1 балл (лёгкие вопросы). Если процент правильных ответов попадал в интервал от 50 до 84%, вопрос оценивался как умеренно сложный (2 балла). Те вопросы, на которые верно ответили менее половины участников анкетирования, оценивались как очень сложные (3 балла). Показатели прогнозируемой и фактической сложности сравнивались между собой, результаты представлены в табл. 3.

Из таблицы видно, что в 66% случаев (24 вопроса) прогнозируемая и фактическая сложность вопросов не совпали, причём в 23 вопросах из 24 (96%) фактическая сложность оказалась выше, чем прогнозируемая. При составлении предполагалось, что анкета в основном ориентирована на вопросы умеренной сложности (58%), однако включает некоторое количество лёгких (28%) и очень сложных (14%) вопросов. При анализе фактической сложности оказалось, что в анкете очень мало лёгких вопросов (6%), большинство

Таблица 3. Сравнительная структура сложности анкет

Вопрос №	Степень сложности	
	Прогнозируемая (по оценке экспертов)	Фактическая (по результатам анкетирования)
Тема 1. Общие вопросы клинической микробиологии		
1	Умеренно сложный	Очень сложный
2	Умеренно сложный	Очень сложный
3	Умеренно сложный	Очень сложный
4	Умеренно сложный	Очень сложный
5	Лёгкий	Лёгкий
6	Лёгкий	Умеренно сложный
Тема 2. Спектр активности антимикробных препаратов		
7	Лёгкий	Умеренно сложный
8	Лёгкий	Умеренно сложный
9	Умеренно сложный	Умеренно сложный
10	Умеренно сложный	Лёгкий
11	Лёгкий	Умеренно сложный
12	Умеренно сложный	Очень сложный
13	Лёгкий	Очень сложный
14	Лёгкий	Очень сложный
15	Лёгкий	Очень сложный
16	Умеренно сложный	Очень сложный
Тема 3. Безопасность антимикробных препаратов		
17	Умеренно сложный	Очень сложный
18	Умеренно сложный	Умеренно сложный
19	Умеренно сложный	Очень сложный
20	Умеренно сложный	Очень сложный
21	Умеренно сложный	Умеренно сложный
22	Умеренно сложный	Очень сложный
23	Умеренно сложный	Умеренно сложный
Тема 4. Общие вопросы антибиотикорезистентности		
24	Лёгкий	Умеренно сложный
25	Лёгкий	Очень сложный
26	Умеренно сложный	Умеренно сложный
27	Умеренно сложный	Очень сложный
28	Умеренно сложный	Очень сложный
29	Умеренно сложный	Умеренно сложный
Тема 5. Данные локального микробиологического мониторинга		
30	Умеренно сложный	Очень сложный
31	Очень сложный	Очень сложный
32	Очень сложный	Очень сложный
33	Очень сложный	Очень сложный
34	Умеренно сложный	Очень сложный
35	Очень сложный	Очень сложный
36	Очень сложный	Очень сложный

же вопросов (64%) оказались для респондентов очень сложными.

Полученные результаты дают серьёзную почву для размышлений. Несоответствие прогнозируемой и фактической сложности для большинства вопросов анкеты говорит о том, что в своей образовательной деятельности клинические фармакологи ориентируются на более высокий предполагаемый уровень знаний врачей, чем он есть в реальности. В результате возникает дисбаланс между известным и новым в представляемой информации, то есть большая её часть просто непонятна слушателям. Это, в свою очередь, приводит к дискредитации образовательных мероприятий, поскольку восприятие слишком большого объёма совершенно новой информации вызывает трудности и, соответственно, снижение интереса.

При сопоставлении результатов анкетирования в разрезе специальностей удивляет тот факт, что в группе реаниматологов самый низкий средний уровень знаний и самый большой разброс по результатам. По ожиданиям исследователей, именно среди врачей этой специальности предполагался самый высокий средний балл, поскольку реаниматологи чаще всего сталкиваются с бактериальными инфекциями, в том числе вызванными резистентной микрофлорой. Отчасти неожиданные результаты можно объяснить тем, что стаж большинства реаниматологов, принявших участие в анкетировании (8 из 12 человек), не превышал 5 лет.

Влияние стажа на уровень знаний в области клинической микробиологии и рациональной антимикробной терапии имеет огромное практическое значение. Ведь наибольшим авторитетом в медицинском сообществе пользуются именно доктора, имеющие более длительный опыт практической деятельности. Вероятно, такие результаты отчасти объясняются накоплением большого объёма узкоспециализированных знаний, которые вытесняют «ненужную» информацию о бактериях и антибиотиках.

Также результаты проведённого анкетирования заставляют задуматься о причинах сложившейся ситуации. К сожалению, в программе медицинских ВУЗов вопросу антибиотикорезистентности и рациональному назначению АМП уделяется очень мало внимания, поэтому у будущих медиков не формируется представление о взаимосвязи между знаниями и действиями каждого конкретного доктора и ростом антибиотикорезистентности [4]. При составлении же программы своего последипломного образования каждый врач отдаёт предпочтение узкоспециализированным мероприятиям, дающим знания и навыки, необходимые для лучшего выполнения каждодневной работы. По мнению большинства врачей, знания в области клинической микробиологии и клинической фармакологии антибиотиков не входят в перечень знаний, необходимых для профессионального совершенствования, именно поэтому мероприятия, посвящённые рациональной антимикробной терапии, в большинстве случаев игнорируются специалистами.

Заключение

Даже по результатам пилотного исследования в одном стационаре можно сделать ряд выводов как теоретического, так и прикладного характера.

Так, незнание данных локального мониторинга говорит о том, что система информирования несовершенна, и актуальная информация не доходит до лечащих врачей. Очевидно, что необходимо менять способ доведения результатов локального микробиологического мониторинга до сведения врачей отделений.

Исследование показало, что при формировании образовательной программы для врачей клиническим фармакологам лечебных учреждений необходимо более корректно оценивать исходный уровень знаний и преподносить информацию в доступной для слушателей форме. Для оценки имеющихся знаний оптимально использовать небольшие тестовые опросники. С одной стороны, такая форма не отнимает у врачей много времени, с другой стороны, позволяет не только получить объективное представление об уровне знаний в целом, но и выявить наиболее частые ошибки или темы, на которые стоит обратить более пристальное внимание.

Кроме того, кажется целесообразным пересмотреть формат мероприятий. Длительные конференции, затрагивающие несколько проблем, также создают перенасыщение новой, неизвестной ранее информацией, что вызывает существенные затруднения в её усвоении и, как следствие, снижение интереса. Для слабо подготовленных слушателей лучше подходят краткие лекции, затрагивающие одну тему. Такая форма обучения позволяет адаптировать представляемый материал к потребностям конкретной аудитории, делая мероприятие максимально эффективным.

Анкетирование продемонстрировало, что основные усилия необходимо направить на обучение молодых специалистов, ведь именно в первые годы практической деятельности идет активное накопление знаний и закладывается информационный фундамент для дальнейшего профессионального развития [5]. Соответственно, актуализация проблемы антибиотикорезистентности и активное обучение начинающих докторов клинической фармакологии антибактериальных средств, основным принципам формирования антибиотикорезистентности, клинической микробиологии поможет в дальнейшем сформировать поколение специалистов, осознающих важность рационального назначения АМП и обладающих достаточными для этого знаниями. Именно эти доктора в ближайшем будущем станут наиболее инициативной, динамично развивающейся частью медицинского сообщества, и их взгляд на те или иные вопросы будет во многом определять стратегию и тактику развития медицины.

Однако игнорирование в образовательных мероприятиях опытных докторов, обладающих определённым авторитетом, может привести к противоречиям между информацией, представляемой специалистами в области антимикробной терапии и признанными лидерами из других областей медицины. А именно на советы старших коллег зачастую ориентируются врачи при выборе тактики применения АМП [4, 6]. Поэтому целесообразно вовлекать докторов с большим опытом практической работы в образовательные ме-

Таблица 4. Примерный план обучения для врачей хирургических специальностей на первое полугодие 2017 г.

Занятие №	Тема	Освещаемые вопросы
1	Пиелонефрит	
2	Инфекции желчевыводящих путей	Этиология инфекций в зависимости от локализации и условий возникновения; обоснованный выбор стартовой эмпирической антибактериальной терапии
3	Простатит, орхоэпидидимит	
4	Инфекции толстого кишечника	
5	Перитонит, абдоминальный сепсис	
6	Уросепсис	
7	Схемы стартовой эмпирической антибактериальной терапии в хирургии на 2017 год	Предпосылки для изменения схем стартовой эмпирической антибактериальной терапии
8	Схемы стартовой эмпирической антибактериальной терапии в урологии на 2017 год	
9	Ингибиторзащищенные аминопенициллины	
10	Фторхинолоны	Клинико-фармакологические особенности антибактериальных препаратов: спектр действия, показания, безопасность
11	Карбапенем без антисинегнойной активности	
12	Антисинегнойные карбапенемы	
13	Аминогликозиды	

роприятия, предназначенные для молодых специалистов, однако обозначать это участие как наставничество или курирование групп начинающих докторов. Такая форма участия поможет привлечь к обучению опытных врачей, не вызывая при этом негатива и не подрывая авторитета в глазах молодых коллег.

При этом если для начинающих специалистов подходят классические образовательные мероприятия — лекции, семинары, при условии грамотного преподнесения информации с учётом исходного уровня знаний, то для докторов со стажем оптимальной формой ненавязчивого обучения будет личное общение «на рабочем месте» и разбор клинических случаев.

В качестве примера можно привести план обучения, разработанный для врачей хирургических специальностей с учётом исходного уровня знаний и наиболее проблемных вопросов (табл. 4). Также руководитель хирургической службы и заведующие отделениями высказали свои пожелания по форме и структуре образовательных мероприятий, а именно проводить обучение в форме лекций, не превышающих по длительности

15—20 мин и освещающих какую-то одну нозологию или клиническую ситуацию.

Если же говорить о низком уровне знаний врачей в области антибиотикорезистентности и антимикробной терапии как о проблеме общественного здравоохранения в целом, то становится очевидной необходимость изменения прежде всего программы обучения будущих врачей. Актуализировать проблему надо ещё на этапе получения базовых знаний, чтобы в дальнейшем врачи понимали, что наряду с узкоспециализированными знаниями, помогающими выполнять необходимые врачебные манипуляции, знания в области клинической микробиологии и рациональной антибактериальной терапии не менее важны для успешного выздоровления пациентов.

Немногочисленная группа проанкетированных докторов и участие в опросе только одного центра не позволяет делать обобщающие заключения. Чтобы понять, имеются ли общие тенденции или для каждого стационара характерны свои особенности, необходимо вовлечение в исследование большего числа центров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «клиническая фармакология»: Приказ Министерства здравоохранения России от 02.11.2012 N 575н: Зарегистрирован в Минюсте России 20.12.2012 N 26215// Текст документа получен с помощью интернет ресурса КонсультантПлюс [www.consultant.ru] / Ob utverzhdenii Poryadka okazaniya meditsinskoj pomoshchi po profilyu klinicheskaya farmakologiya: Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya Rossii ot 02.11.2012 N 575n: Zaregistrirovano v Minyuste Rossii 20.12.2012 N 26215// Tekst dokumenta poluchen s pomoshch'yu internet resursa KonsultantPlus [www.consultant.ru] [in Russian]
2. Государственный реестр лекарственных средств. Интернет ресурс [http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx]. / Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv. Internet resurs [http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx]. [in Russian]
3. Рациональная антимикробная терапия: руководство для практикующих врачей / под ред. Яковлева С.В. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Литтэра, 2015. — 1040 с. / Ratsional'naya antimikrobnaya terapiya: rukovodstvo dlya praktikuyushchikh vrachey / pod red. Yakovleva S.V. — 2-e izd., pererab. i dop. M.: Litterra, 2015; 1040. [in Russian]
4. Всемирная Организация Здравоохранения. Возрастающая угроза развития антимикробной резистентности: возможные меры. 2013. — 130 с. Интернет ресурс [www.who.int]. / Vsemirnaya Organizatsiya Zdravookhraneniya. Vozrastayushchaya ugroza razvitiya antimikrobnoy rezistentnosti: vozmozhnye меры. 2013; 130. Internet resurs [www.who.int]. [in Russian]
5. Antimicrobial stewardship / Edited by Laundry M, Gilchrist M, Whitney L. — Oxford: Oxford University Press, 2016; 148.
6. Pulcini C., Williams F., Molinari N., Davey P., Nathwani D. Junior doctor's knowledge and perceptions of antibiotic resistance and prescribing: a survey in France and Scotland. Clin Microbial Infect 2011; 17: 80—87.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. — М., Практика, 1998. — 459 с.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ни Оксана Геннадьевна — заведующий отделом клинической фармакологии, врач-клинический фармаколог ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2», Краснодар

Очаковская Ирина Николаевна — врач-клинический фармаколог отдела клинической фармакологии ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2» г. Краснодара, ассистент кафедры клинической фармакологии и функциональной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар

Шабанова Наталья Евгеньевна — к. м. н., врач-клинический фармаколог отдела клинической фармакологии ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2» г. Краснодара, доцент кафедры клинической фармакологии и функциональной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар

Пенжоян Григорий Артемович — д. м. н., профессор, главный врач ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2» г. Краснодара, заведующий кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар

Модель Галина Юрьевна — заместитель главного врача ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2» г. Краснодара по педиатрической помощи, Краснодар

Яковлев Сергей Владимирович — д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии №2 лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Применение турбидиметрического метода анализа для стандартизации и оценки качества антибиотиков группы аминогликозидов и лекарственных препаратов на их основе

Ю. В. ОЛЕФИР, *Е. Н. СЕМЁНОВА, С. И. КУЛЕШОВА, Е. И. САКАНЯН, С. А. ПРОЦАК

Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва

Turbidimetric Method for Standardization and Quality Control of Aminoglycoside Antibiotics and Aminoglycoside-Based Products

YU. V. OLEFIR, *E. N. SEMENOVA, S. I. KULESHOVA, E. I. SAKANYAN, S. A. PROTSAK

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

Рассмотрены микробиологические методы, позволяющие оценить биологическую активность антибиотиков, как фундаментальную основу, определяющую клиническую эффективность антибактериальных препаратов. На примере аминогликозидного антибиотика гентамицина описана разработка и валидация количественного определения гентамицина турбидиметрическим методом, основанном на ингибирующем эффекте антибиотика на рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P в жидкой питательной среде. Полученные данные были подвергнуты обработке с помощью дисперсионного анализа и признаны линейными ($r=0,9921$) в диапазоне концентраций от 0,64 до 1,56 мкг/мл. Результаты валидационных испытаний методики количественного определения гентамицина свидетельствуют о перспективности и целесообразности применения метода турбидиметрии в стандартизации и последующей оценке качества аминогликозидных антибиотиков.

Ключевые слова: аминогликозидный антибиотик, количественное определение, турбидиметрический метод, стандартизация, оценка качества.

The article covers microbiological methods that help assess the biological activity of antibiotics, which is fundamental for determination of clinical efficacy of antimicrobial drugs. The authors chose gentamicin, an aminoglycoside antibiotic, to illustrate the development and validation of the turbidimetric assay, which is based on antibiotic's inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P test strain in liquid medium. The obtained data were assessed with ANOVA and were recognized as linear ($r=0.9921$) in the concentration range of 0.64—1.56 mg/ml. The results of gentamicin assay validation studies demonstrate great potential and applicability of the turbidimetric method for standardization and ensuing quality control of aminoglycoside antibiotics.

Keywords: aminoglycoside antibiotic, assay, turbidimetric method, standardization, quality control.

Введение

Аминогликозидные антибиотики относятся к числу наиболее важных в практическом отношении лекарственных препаратов, применяемых в лечении инфекционных болезней, ввиду их широкого спектра антимикробного действия, включающего основных представителей грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [1, 2].

Гентамицин — аминогликозидный антибиотик, продуцируемый *Micromonospora purpurea* [1]. На российском фармацевтическом рынке гентамицина сульфат представлен лекарственными препаратами в различных лекарственных формах (крем, мазь, капли глазные и ушные, раствор для парентерального введения) как самостоятельно,

так и в комбинации с другими действующими веществами.

Оценивая место и значение гентамицина в современной антибиотикотерапии бактериальных инфекций, необходимо отметить, что лекарственные средства на его основе по-прежнему остаются препаратами выбора, предназначенными для лечения тяжёлых форм инфекционно-воспалительных заболеваний, вызываемых чувствительными к нему микроорганизмами [1—3]. Гентамицин включён в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения 2018 года. Вместе с тем, следует учитывать достаточно серьёзные нежелательные реакции (ото- и нефротоксичность, нейромышечная блокада), которые могут возникнуть в результате его передозировки. С другой стороны, использование противомикробных препаратов, в целом, сегодня требует особой осторожностью.

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 127051 Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2. НЦЭСМП

ти в связи со стремительным распространением антибиотикорезистентности микроорганизмов. К этому, как правило, приводит применение некачественных антибиотиков и неизбирательное их использование. Следовательно, особое внимание необходимо уделять вопросам стандартизации и обеспечения качества антибактериальных препаратов, и вытекающей из этого их клинической безопасности и эффективности. [4].

Для определения биологической активности лекарственных средств на основе гентамицина в отечественной фармакопейной практике применяется метод диффузии в агар [5]. Этот метод основан на способности молекул антибиотиков диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны угнетения, в которых не развиваются тест-микроорганизмы, чувствительные к испытываемому антибиотику. Несмотря на то, что метод диффузии в агар прост, не нуждается в сложном оборудовании, обеспечивает удовлетворительную чувствительность и селективность, он характеризуется рядом недостатков: длительность проведения анализа; зависимость аналитического сигнала от свойств антибиотика (его растворимости, молекулярной массы и т.п.), не связанных с его активностью; чувствительность тест-культур к качеству используемого агара; сложность автоматизации и некоторые другие [6, 7].

Это привело к необходимости поиска альтернативного метода оценки биологической активности антибиотиков, среди которых наше внимание привлёк метод турбидиметрии, отличающийся, прежде всего, оперативностью, экономичностью, а также инструментальным способом регистрации аналитического сигнала.

Цель работы заключается в разработке турбидиметрической методики количественного определения гентамицина сульфата.

Материал и методы

Препараты антибиотиков, реактивы и материалы. В работе были использованы: препарат «Гентамицин, раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 40 мг/мл», Россия; стандартный образец (СО) гентамицин сульфат — GS EPCRS (активность — 17352 IU/vial, batch 14, действительный на момент исследования). Для приготовления основных растворов стандартного и испытываемого образцов использовали воду очищенную, полученную на установке «Millipore», рабочие растворы готовили с буфером №4 (ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар). Для разработки методики были использованы химические реактивы отечественного и импортного производства с квалификацией не ниже «х.ч.».

Микроорганизмы, питательные среды. В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (для турбидиметрического анализа); *Bacillus pumilus* NCTC 8241 (для метода диффузии в агар), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. При проведении турбидиметрического анализа применяли экспериментальную питательную среду (ЭПС), содержащую

компоненты отечественного производства: панкреатический гидролизат казеина (ПГК) (ТУ 9229-240-78095326-2016); гидролизат мяса ферментативный (ГМФ) (ФСП 42-0487-4245-03); экстракт кормовых дрожжей (ТУ 9385-090-14237183-08) и D-глюкоза (ГОСТ 6038-79). pH используемой среды составил $7,2 \pm 0,2$. Определение биологической активности методом диффузии в агар проводили по ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

Условия эксперимента. Штаммы тест-микроорганизмов инкубировали в ЭПС при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. В день испытания бульонную культуру разбавляли для достижения мутности суспензии $25 \pm 2\%$ (коэффициент пропускания) с использованием спектрофотометра Agilent 8453 (США) и длины волны 580 нм. Полученную суспензию использовали в качестве посевного материала. Для турбидиметрического анализа была выбрана трёхдозная модель параллельных линий (3×3 дизайн; 3 дозы стандарта и 3 дозы образца). Первоначально соответствующий объём ЭПС инокулировали в количестве 0,5; 1,0 и 3,0%. Затем 9 мл инокулированной среды и 1 мл испытываемого или стандартного раствора (при концентрации 0,67; 1 и 1,5 мкг/мл) вносили в пробирку объёмом 20 мл. После этого анализируемые смеси инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 4,5 ч. Одновременно инкубировали отрицательный контроль (9 мл стерильной ЭПС и 1 мл буфера №4) и положительный контроль (9 мл инокулированной ЭПС и 1 мл буфера №4). Все пробирки, содержащие стандартный и испытываемый образец в разных концентрациях, были подготовлены в шести экземплярах и распределены по схеме латинского квадрата.

По завершении процесса инкубации размножение микроорганизмов останавливали добавлением 0,5 мл 12% раствора формальдегида к каждой из пробирок, в том числе положительных и отрицательных контролей. Оптическую плотность бактериальной популяции в пробирках с испытываемым и стандартным образцами, а также контрольных пробирок определяли при длине волны 530 нм.

После установления оптимальных условий для получения кривой «доза—реакция», была проведена валидация методики путём определения следующих параметров: линейность, правильность, прецизионность, устойчивость и специфичность [5, 8]. Расчёт биологической активности антибиотиков, математическую и статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с существующими рекомендациями [5] с помощью программных обеспечений Microsoft Office Excel и CombiStats, version 5.0.

Результаты и обсуждение

Определение оптимальных аналитических условий. Турбидиметрический анализ оценки биологической активности антибиотиков основан на взаимодействии между тест-микроорганизмом и антибиотиком. Это взаимодействие выражается в логарифмической зависимости степени угнетения роста бактериальной популяции от концентрации антибиотика. Линейный отклик обычно происходит в ограниченном диапазоне концентраций антибиотика и определённой фазе роста тест-микроорганизма (фаза логарифмического роста).

Выбор микроорганизма является важнейшим вопросом в турбидиметрическом биотестировании, так как он должен характеризоваться чувствительностью к антибиотику и не очень высокими ростовыми потребностями, давая быстрый, равномерный рост в жидкой питательной среде без образования плёнки и выраженного осадка.

Таблица 1. Определение оптимальных условий количественного определения гентамицина турбидиметрическим методом

Параметр	Проанализированные условия	Выбранные условия
Тест-микроорганизм	<i>S.aureus</i> ATCC 6538P; <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228; <i>K.pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>S.aureus</i> ATCC 6538P
Концентрация инокулята (%)	0,5; 1; 3;	1
Диапазон концентраций антибиотика (мкг/мл)	0,5; 0,75; 1,125 0,64; 0,8; 1; 1,25; 1,56 0,5; 1; 2; 4	0,64; 0,8; 1; 1,25; 1,56
Время инкубации (ч)	3,5; 4,5; 5,5;	4,5

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа определения биологической активности гентамицина турбидиметрическим методом

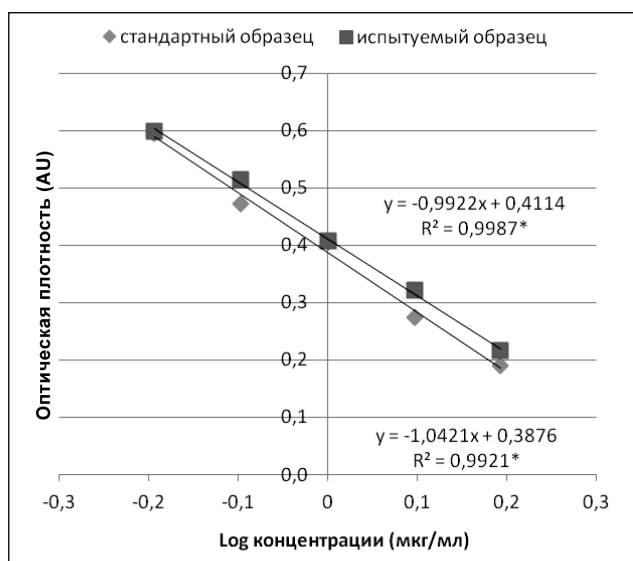
Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	F _{набл.}	F _{критич.}	p, %
Регрессия	1	0,902609	0,902609	625,722	>8,1	99
Параллельность	1	0,000689319	0,000689319	0,478	<4,35	95
Линейность стандарт	2	0,000643511	0,000321755	0,223	<4,35	95
испытуемый	1	0,000642937	0,000642937	0,446		
испытываемый	1	0,00000104	0,00000104	0,001		
Квадратичность	1	0,000313174	0,000313174	0,217	<4,35	95
Разность квадратичностей	1	0,000330337	0,000330337	0,229	<4,35	95

В ходе выполненных исследований были изучены основные параметры с целью определения наиболее оптимальных условий турбидиметрического анализа (табл. 1). Подбор экспериментальных условий позволил установить оптимальную зависимость «доза–реакция» и определить корреляцию между оптической плотностью бактериальной популяции и концентрацией антибиотика. В результате растворы с концентрацией гентамицина в диапазоне от 0,64 до 1,56 мкг/мл оценивали, используя ЭПС инокулированную *S.aureus* ATCC 6538P в количестве 1% после 4,5 ч инкубации.

Валидация методики. Для обоснования применения методики количественного определения гентамицина в лекарственных препаратах турбидиметрическим методом были выполнены валидационные испытания. Валидация проводилась на двух уровнях: путём определения валидационных параметров (линейность, правильность, прецизионность, устойчивость и специфичность) и в сравнении с валидированным фармакопейным методом диффузии в агар.

Проверка линейности. Модель параллельных линий предполагает, что взаимосвязь между логарифмом доз и оптической плотностью бактериальной популяции должна быть представлена в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных концентраций; прямая линия испытуемого образца должна быть параллельна соответствующей прямой линии стандартного образца [5, 9].

Зависимость «доза–реакция» для растворов стандартного и испытуемого образцов была построена с использованием среднего значения оптической плотности бактериальной популяции, полученного по результатам шести независимых определений, от логарифма концентрации анти-



Зависимость оптической плотности бактериальной популяции от концентрации гентамицина.

Примечание. * – уравнения линейной регрессии и значения коэффициентов корреляции: $y = -1,0421x + 0,3876$; $R^2 = 0,9921$ для стандартного образца; $y = -0,9922x + 0,4114$; $R^2 = 0,9987$ для испытуемого образца.

биотика и продемонстрировала линейность в диапазоне концентраций гентамицина от 0,64 до 1,56 мкг/мл (рис. 1).

Дисперсионный анализ показал правильность результатов опыта: значительную регрессию ($p < 0,01$) и отсутствие отклонений от линейности и параллельности, в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [5] (табл. 2).

Прецизионность методики была оценена на двух уровнях: повторяемость (образец анализиро-

Таблица 3. Результаты проверки правильности количественного определения гентамицина турбидиметрическим методом

Теоретическая активность стандартного образца, %	Найденная активность стандартного образца, %	Восстановление, %	Средний процент восстановления, %	RSD, %
80	78,95	98,69	99,76	0,93
100	100,2	100,2		
120	120,45	100,38		

Таблица 4. Результаты проверки устойчивости количественного определения гентамицина турбидиметрическим методом

Параметр	Модифицированные условия	Нормальные условия	Устойчивость методики
Время инкубации, мин	265	270	Устойчива
	275		
Длина волны, нм	525	530	Устойчива
	535		
Объём среды в пробирки, мл	9,9	10	Устойчива
	10,1		
Концентрация инокулята, %	0,5	1	Не устойчива
	1,5		

Таблица 5. Сравнительная оценка биологических методов количественного определения гентамицина

Метод анализа	Чувствительность, мкг/мл	Время выполнения анализа (инкубации), ч	Среднее содержание гентамицина, %	RSD, %
Турбидиметрическая методика	0,64	4,5	97,1	1,25
Диффузия в агар	1	18–20	94,8	1,83

вали в 6 повторностях в одинаковых условиях) и промежуточная прецизионность (в течение 3 дней). Сходимость не превышала 1,05% (RSD), междневная прецизионность составляла 2,02% (RSD). В целом прецизионность указывает на хорошую согласованность результатов множественного анализа образца, что свидетельствует о точности валидируемой методики.

Правильность оценивали по результатам анализа модельных растворов с известными концентрациями антибиотика, приготовленными методом добавок (табл. 3). Полученные данные показывают, что валидируемая методика является правильной, так как средний процент восстановления при использовании концентраций в диапазоне 80, 100 и 120%, находится в пределах от 98 до 102%.

Устойчивость методики определяли путём анализа образца в различных условиях (табл. 4). Данные, полученные при изменении таких параметров, как время инкубации, длина волны и конечный объём среды в анализируемой пробирке статистически не отличаются от данных, полученных в стандартных условиях. Установлено, что вариации с концентрацией инокулята оказывают влияние на устойчивость методики, что свидетельствует о важности данного параметра и необходимости его контроля.

Специфичность методики была подтверждена использованием высокочувствительного к гентамицину тест-микроорганизма *S.aureus* ATCC 6538P, а также статистической обработкой результатов, полученных с применением валидиру-

емой турбидиметрической методики и фармакопейного метода диффузии в агар (табл. 5). На основании данных анализа можно сделать вывод о том, что с вероятностью 95% не существует статистически значимых различий между результатами, полученными с использованием обеих методик ($t_{\text{расч.}}=1,9 < t_{\text{крит.}}=2,78$).

Закключение

В результате проведённых исследований, разработана методика количественного определения гентамицина турбидиметрическим методом. Подобраны тест-микроорганизм, питательная среда, время инкубации и диапазон концентраций антибиотика, оптимальные для проведения анализа. Выполнена процедура валидации методики и получены удовлетворительные результаты по всем валидационным параметрам. Статистический анализ показал, что метод диффузии в агар и турбидиметрический анализ могут считаться взаимозаменяемыми. Вместе с тем, турбидиметрический метод обладает преимуществами в отношении чувствительности, времени, затраченного на проведение анализа, и экономичности, ввиду уменьшения затрат на термостатирование.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Навашин С.М., Фомина И.П., Сазыкин Ю.О.* Антибиотики группы аминогликозидов. — М.: Медицина; 1977. / *Navashin S.M., Fomina I.P., Sazykin Yu.O.* Antibiotiki gruppy aminoglikozidov. M.: Meditsina; 1977. [in Russian]
2. *Durante-Mangoni E., Grammatikos A., Utili R. et al.* Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 33: 201–205.
3. *Vakulenko S., Mobashery S.* Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16: 3: 430–450.
4. *Семенова Е.Н., Саканян Е.И., Кулешова С.И.* Сравнительная характеристика методов количественного определения, используемых при стандартизации и последующей оценке качества антибиотиков. *Вестн. военно-мед. академии.* — 2017. — Т. 59. — № 3. — С. 140–146. / *Semenova E.N., Sakanyan E.I., Kuleshova S.I.* Sravnitel'naya kharakteristika metodov kolichestvennogo opredeleniya, ispol'zuemykh pri standartizatsii i posleduyushchej otsenke kachestva antibiotikov. *Vestn voenno-med akademii* 2017; 59: 3: 140–146. [in Russian]
5. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Государственная фармакопея РФ. XIII изд. М.: ФЭМБ, 2015. / *Ministerstvo zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii. Gosudarstvennaya farmakopeya RF. XIII izd. M.: FEMB, 2015.* [in Russian]
6. *Кулешова С.И.* Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* — 2015. — № 3. — С. 13–17. / *Kuleshova S.I.* Opredelenie aktivnosti antibiotikov metodom diffuzii v agar. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya.* 2015; 3: 13–17. [in Russian]
7. *Берштейн Е.М.* Современные биологические методы оценки активности антибиотиков. *Антибиотики и химиотер.* — 1991. — Т. 36. — № 6. — С. 50–53. / *Bershtejn E.M.* Sovremennye biologicheskie metody otsenki aktivnosti antibiotikov. *Antibiotiki i khimioter* 1991; 36: 6: 50–53. [in Russian]
8. *Юргель Н.В., Младенцев А.Л., Бурдейн А.В., Гетьман М.А., Малин А.А., Косенко В.В.* Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007. / *Yurgel' N.V., Mladentsev A.L., Burdejn A.V., Get'man M.A., Malin A.A., Kosenko V.V.* Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv. M.: Ministerstvo zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya RF, 2007. [in Russian]
9. *Hewitt W.* Microbiological assay for pharmaceutical analysis. *Interharm/CRC*; 2003.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Олефир Юрий Витальевич — д. м. н., генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Семенова Екатерина Николаевна — Эксперт 2 категории лаборатории антибиотиков Испытательного Центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Кулешова Светлана Ивановна — к. б. н., начальник лаборатории антибиотиков Испытательного Центра экспер-

тизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Саканян Елена Ивановна — д. фарм. н., профессор, директор Центра Фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Процак Светлана Александровна — главный эксперт лаборатории антибиотиков Испытательного Центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Экзополисахариды морских бактерий: перспективы применения в медицине

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, Т. П. СМОЛИНА¹, Б. Г. АНДРЮКОВ¹,
Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, В. В. МИХАЙЛОВ², Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА²

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Exopolysaccharides of Marine Bacteria: Prospects for Use in Medicine

N. N. BESEDNOVA¹, T. P. SMOLINA¹, B. G. ANDRYUKOV¹, T. A. KUZNETSOVA¹, V. V. MIKHAILOV², T. N. ZVYAGINTSEVA²

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok

В обзоре представлены основные направления биомедицинских исследований, посвящённых экзополисахаридам (ЭПС), полученным из различных видов морских бактерий. ЭПС — высокомолекулярные полимеры, состоящие из остатков сахаров и отличающиеся большим разнообразием структуры, что обуславливает их уникальные биологические свойства. Приведены многочисленные данные, касающиеся антиоксидантной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активности ЭПС. Особое внимание обращается на противовирусное, антибактериальное и ингибирующее действие ЭПС на формирование биоплёнок. С учётом широкого спектра фармакологической активности и низкой токсичности эти соединения привлекают к себе внимание в качестве потенциального источника лекарственных субстанций.

Ключевые слова: морские бактерии, экзополисахарид, антиоксидант, иммуномодулятор, противоопухолевая активность.

The review presents the main directions of biomedical research on exopolysaccharides (EPS) obtained from various species of marine bacteria. EPS are high molecular weight polymers consisting of sugar residues; they are characterized by a large variety of structures, which causes unique biological properties. Numerous data on antioxidant, immunomodulatory, and antitumor activity of EPS are presented. Particular attention is drawn to the antiviral, antibacterial, and inhibitory effect of EPS on the formation of biofilms. Taking into account the wide spectrum of pharmacological activity and low toxicity, these compounds have attracted attention as a potential source of medicinal substances.

Keywords: marine bacteria, exopolysaccharide, antioxidant, immunomodulator, antitumor activity.

Человечество с давних времен стремилось использовать сырьевое богатство Океана, в том числе и в качестве источника новых лекарств. За последние 50 лет было получено более 25000 новых соединений из морских организмов, при этом прирост их числа составил около 5% в год [1]. Более 90% океанической биомассы морей и океанов составляют микроорганизмы, включая микроводоросли. Микроорганизмы являются важной составной частью морских экосистем. Ещё сравнительно недавно среди исследователей была распространена точка зрения о прокариотах как о микроорганизмах, попавших в море со стоками рек или в результате эолового переноса (перенос песчаных и пылевых частиц ветром). На самом деле экосистемы океана, являясь древнейшими на земле, имеют отличную от суши микробиоту [2, 3]. Экстремальные условия

существования морских микроорганизмов в условиях низких или высоких температур, высокого давления и отсутствия света привели к развитию у них уникального метаболизма. В настоящее время морские микроорганизмы рассматриваются как источник необычных по химическому строению природных соединений, обладающих богатейшим фармацевтическим потенциалом [2—5].

Микроорганизмы океанов составляют примерно половину первичной продукции органических веществ на Земле [6], и важное место среди них занимают экзополисахариды (ЭПС) — высокомолекулярные полимеры, состоящие из остатков сахаров, которые секретируются микроорганизмами в окружающую их среду и могут служить барьером между клетками и окружающей средой, а также для прикрепления к твёрдым поверхностям. Эти соединения отличаются большим разнообразием структурных комбинаций, обуславливающих уникальные индивидуальные биологические свойства.

© Коллектив авторов, 2018

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

Бактерии, продуцирующие ЭПС, постоянно присутствуют в морских экосистемах и могут быть выделены из толщи воды, донных отложений, от представителей морской флоры и фауны и т. д. [7]. Эти соединения привлекают к себе внимание в качестве потенциального источника лекарственных субстанций, поскольку они часто не токсичны, обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, противовоспалительным, антимикробным, антибиоплёночным действием.

ЭПС выделяют из различных морских бактерий: *Bacillus*, *Holomonas*, *Planococcus*, *Enterobacter*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Rhodococcus* и др. К настоящему времени в этом отношении лучше изучены виды родов *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* и *Vibrio* [8]. ЭПС морских бактерий представляют собой капсульный полисахарид, ковалентно связанный с поверхностью бактериальной клетки, либо полисахариды слизи, не связанные или слабо связанные с поверхностью клетки, либо высвобождающиеся в окружающую среду [5, 9].

В соответствии со структурой ЭПС подразделяются на гомо-, гетерополисахариды, а также полисахариды с нерегулярной структурой. Различные типы неорганических и органических заместителей (сульфаты, фосфаты, ацетаты, простые эфиры, аминокислоты, лактаты, пируваты) могут включаться в гомополисахариды, которые могут быть разветвлёнными или линейными [7, 10].

По источнику получения ЭПС можно разделить на природные и полусинтетические, получаемые путём химической или ферментативной модификации исходных макромолекул [11]. Молекулярная масса полисахаридов варьирует от 50 до нескольких тысяч kDa.

Экзополисахариды морских бактерий выгодно отличаются от полисахаридов из наземных бактерий, растений и водорослей тем, что для морских бактерий можно создать определённые воспроизводимые контролируемые параметры производства, в результате чего исключается экологическое воздействие и достигается высокое качество конечного продукта [12]. В последние годы исследования большинства учёных нацелены на изучение ЭПС из экстремофилов. Считается, что поскольку эти микробы выживают в сложных условиях высыхания, высокой или низкой температуры, высокого атмосферного давления, то следует ожидать от ЭПС, полученных из них, уникальных свойств [13]. К таким микроорганизмам относятся, например, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, *Vibrio diabolicus*, *Alteromonas* и др.

Микробные ЭПС нашли применение в медицине с середины XX века. Так, тестирование нескольких тысяч штаммов морских микроорганизмов позволило установить, что наиболее распространёнными среди метаболитов микрооргани-

зов, в том числе и среди ЭПС, являются противоопухолевые соединения, что отличает морские организмы от почвенных и пресноводных. Среди метаболитов обнаружены также соединения с иммуномодулирующими, противовоспалительными, противовирусными и противобактериальными свойствами [2].

Потребность в новых лекарствах — важнейший вопрос для медицины, который можно в определённой степени разрешить путём инновационных технологий, связанных с морскими организмами. Разработка систем с контролируемой доставкой лекарственных средств, а также микро- и наночастиц открыла новую эру в использовании ЭПС и их производных, поскольку эти соединения являются нетоксичными, биоразлагаемыми, в связи с чем могут служить эффективной основой для разработки лекарственных препаратов, а также вакцинных адъювантов [14].

В настоящем сообщении мы не будем останавливаться на промышленном использовании ЭПС из морских бактерий (в пищевой, бумажной, текстильной, нефтяной промышленности, в области экологии и пр.) [15]. Целью данной работы является обзор литературных сведений последних лет, касающихся возможности использования ЭПС морских бактерий в медицине, а также достижений в этой области.

Антиоксидантное действие экзополисахаридов из морских бактерий. Антиоксидантная активность — одна из важнейших характеристик биологически активных соединений, поскольку окислительный стресс сопровождает многие инфекционные и неинфекционные болезни. Окислительные процессы являются также одной из причин порчи пищевых продуктов и косметических средств.

В последние десятилетия опубликовано большое количество работ, свидетельствующих о высоком антиоксидантном потенциале ЭПС из морских бактерий [16, 17]. Так, S. Wu et al. [17] установили наличие выраженной антиоксидантной активности за счёт гашения гидроксильных и супероксидных анион-радикалов у экзополисахарида EPS273, полученного из супернатанта морской бактерии *Pseudomonas stutzeri* 273. Полисахарид состоял из глюкозамина (35,4%), рамнозы (28,6%), глюкозы (27,2%) и маннозы (8,7%). Молекулярная масса соединения составляла около 190 kDa.

Известно, что гидроксид-радикал является весьма сильным окислителем и практически не участвует в образовании других активных форм кислорода, но является важным фактором окислительной модификации многих клеточных структур [18]. Он может окислять молекулы белков и липидов, особенно активно атакуя мембранные липиды, которые содержат ненасыщенные двойные связи. Этот процесс приводит к об-

разованию липидных гидроперекисей и изменению свойств клеточных мембран. Гидроксид-радикал вызывает разрыв связей в молекуле ДНК, что может привести к глубоким повреждениям генетического аппарата клеток. Полисахарид EPS273 при концентрации 60 мкг/мл нейтрализовал до 50% гидроксид-радикалов, концентрация которых намного превышала концентрацию полисахарида.

Супероксид анион является ключевой активной формой кислорода. Он представляет опасность тем, что способен повреждать белки, содержащие железо-серные кластеры (например, сукцинатдегидрогеназу, оксиредуктазу и др.). EPS273 нейтрализовал около 60% супероксид анионов при концентрации 60 мкг/мл. Авторы представляют это соединение в качестве сильного антиоксиданта, который может найти применение в медицине и пищевой промышленности.

M. S. Mohsen et al. [19] исследовали проявления оксидативного стресса при болезни Альцгеймера. При этой патологии происходит интенсивная генерация активных форм кислорода, что связано с нарушениями тканевого дыхания митохондрий, а также с воспалительной реакцией микроглии [20]. В связи с этим агенты, предотвращающие окислительный стресс, могут быть особенно эффективны при лечении болезни Альцгеймера. Авторы применили с этой целью EPS из *Achromobacter piechaudii*, действующий в качестве ингибитора на COX-1, COX-2, и на холинэстеразу. В состав EPS входили арабиноза, ксилоза, фруктоза и галактуроновая кислота в соотношении 4,5:4,0:1,0:0,3, соответственно, его молекулярная масса составляла $5,67 \times 10^3$ г/моль.

Ингибирующий эффект по отношению к COX-2 составил от 21 до 92%, к COX-1 — от 7,77 до 36,22%. Для препарата сравнения (целекоксиба) эти показатели составили: для COX-2 — от 28 до 100% и для COX-1 — от 6,11 до 34,12%. Ингибирующая активность по отношению к холинэстеразе была от 12,36 до 38,35%. Эти эффекты сопровождалась значительным антиоксидантным действием (показатель IC_{50} в мкг/мл для DPPH (diphenyl-picrylhydrazyl) составил $170 \pm 1,01$, для O_2 — $199,3 \pm 0,88$, для H_2O_2 — $205,12 \pm 1,21$, хелатирования железа — $100,80 \pm 0,89$, общей антиоксидантной активности — $73,58 \pm 1,41$).

Как было описано ранее [21], кислые полисахариды содержат больше уроновых кислот и обладают более высокой активностью по удалению радикалов. На антиоксидантную активность полисахаридов могут влиять также пространственная структура, величина молекулярной массы, характер гликозидных связей, разветвления от основной цепи [22]. Всё это свидетельствует о многофакторности антиоксидантного действия ЭПС. Авторы рекомендуют разработанный ими

ЭПС для лечения и/или профилактики в будущем болезни Альцгеймера.

Морские организмы, которые подвергаются воздействию высоких уровней ROS (reactive oxygen species) в океане, продуцируют антиоксиданты в качестве защиты тканей от повреждений, вызванных окислительным стрессом. Определённый вклад в эту защиту вносят микроорганизмы, обитающие на/в этих гидробионтах. Так, P. Priyanka et al. [23] исследовали антиоксидантную активность трёх ЭПС, полученных из бактерий, ассоциированных с морскими организмами (водорослями и беспозвоночными животными), которые были идентифицированы как *Alteromonas* sp. PRIM-21 (содержал 2% сульфата), *Nitratireductor* sp. PRIM-24 (содержал 2% сульфата) и *Enterobacter* sp. PRIM-26 (несульфатированный полисахарид). Все ЭПС, полученные из этих микроорганизмов, обладали антиоксидантной активностью, наиболее высокой у PRIM-26 в отношении супероксида (IC_{50} 0,33 мг/мл-1) и DPPH (IC_{50} 0,44 мг/мл-1). Авторы рекомендуют эти полисахариды для дальнейших биотехнологических исследований.

Морские бактерии являются неисчерпаемым источником новых ЭПС, обладающих антиоксидантными свойствами. Свидетельством этого является, например, и тот факт, что метаболиты большинства морских прокариот, в частности, пигментированных бактерий, обитающих на морских водорослях, как правило, обнаруживают антиоксидантные эффекты [24]. Таким образом, получение новых эффективных антиоксидантов из морских бактерий — перспектива ближайшего будущего.

Иммуномодулирующее действие ЭПС морских микроорганизмов. Распознавание микробов является основополагающим компонентом иммунного ответа, включая воспалительную реакцию. Этот ответ опосредуется рецепторами особого семейства, узнающими общие молекулярные компоненты и получившими название PRR (pattern recognition receptors). После узнавания соответствующего специфического паттерна PRR запускают серию сигнальных каскадов, представляющих первую линию обороны организма от микробов. Инициированный PRR сигнал включает созревание дендритных клеток, подготавливающих формирование адаптивного иммунитета. Первыми идентифицированными PRRs были Toll-like рецепторы (TLRs), опосредующие распознавание молекулярных структур патогенов. Они экспрессируются на клетках разных типов, инициируя развитие иммунных реакций при связывании с различными лигандами.

В последнее десятилетие появляется всё больше работ, касающихся модулирующего действия полисахаридов морских бактерий на иммунную систему позвоночных, благодаря их способности изменять функциональное состояние антиген-

презентирующих клеток (макрофагов, дендритных клеток). В связи с этим представляет интерес работа М.-Н. Lin et al. [25], в которой представлены результаты исследования действия ЭПС, полученного из биоплёнки микроорганизма *Thermus aquaticus* YT-1 — граммотрицательной палочковидной бактерии. В отличие от типичных граммотрицательных бактерий, она не имеет липополисахарида во внешней мембране, что, по-видимому, исключает токсичность соединения. Микроорганизм живет в горячих источниках, гейзерах. Бактерии растут при температуре от 50 до 85°C. ЭПС этих бактерий построен из повторяющихся тетрасахаридных звеньев, состоящих из галактофуранозы, галактопиранозы и N-ацетилгалактозамина (1:1:2). Кислые сахара в ЭПС отсутствовали. Авторы исследовали влияние ЭПС из этого микроорганизма на функциональную активность макрофагов линии RAW 264.7 и продукцию цитокинов. Из неочищенного ЭПС путём гельфильтрации была получена фракция (ТА-1), для которой был показан дозозависимый эффект на продукцию макрофагами $\text{TNF}\alpha$ и IL-6 — провоспалительных цитокинов. Определяли также продукцию макрофагами NO. Было установлено, что ЭПС индуцировал продукцию цитокинов и NO при взаимодействии с TLR2 и что именно TLR2 отвечал за активацию NF- κ B. Таким образом, фракция ЭПС ТА-1, выделенная из *T.aquaticus*, обладала иммунорегуляторной активностью по отношению к макрофагам, играющим значительную роль в иницировании адаптивных иммунных реакций.

Также эффективными модификаторами биологического ответа являются ЭПС из других бактерий — антарктической психрофильной бактерии *Psychrobacter* sp. [26] и антарктической бактерии *Pseudoalteromonas* sp. [27]. Авторы [26] определяют ЭПС из *Psychrobacter* sp. как агонист TLR4. Полисахариды усиливали фагоцитарную активность макрофагов, продукцию ими NO и секрецию провоспалительных цитокинов $\text{TNF}\alpha$ и IL-1 β .

Система комплемента участвует в защите организма от бактериальных инфекций и в устранении клеток опухолей. А. Courtois et al. [28] исследовали влияние двух ЭПС из морских бактерий на систему комплемента. Первый ЭПС (GY785) представлял собой высокомолекулярный (до 10⁶ Da), разветвлённый сульфатированный полисахарид, полученный из глубоководной морской бактерии *Alteromonas infernus*. Второй ЭПС (HE800) — гликозаминогликан, полученный из *Vibrio diabolicus*, имеющий линейную основу и молекулярную массу около 8×10⁵ Da. Ранее было показано, что этот ЭПС положительно влияет на регенерацию кожи и кости [29]. Высокомолекулярные полимеры деполимеризовали для снижения вязкости соединений и усиления их взаимодействия с потенциальными рецепторами или

лигандами. Было доказано взаимодействие между модифицированными ЭПС и белком C1q системы комплемента. Результаты показали, что оба полисахарида дозозависимо активировали классический путь системы комплемента.

Движение нейтрофилов и моноцитов — одних из главных эффекторных клеток врождённого иммунитета — в очаг воспаления начинается с серии адгезионных событий, каждое из которых связано с изменением экспрессии определённого типа поверхностных молекул. В работе Т. П. Смолиной и соавт. [30] показано, что ЭПС морской бактерии *Pseudoalteromonas nigrifaciens* значимо снижал экспрессию L-селектинов (CD62L), но увеличивал экспрессию β -интегринов (CD11b, CD11c) и иммуноглобулинов (CD54) на нейтрофилах и моноцитах. Действие ЭПС *P.nigrifaciens* на изменение уровня экспрессии молекул адгезии нейтрофилов и моноцитов проявлялось уже через 1 ч инкубации. Таким образом, ЭПС оказывал активирующее действие на эффекторные функции клеток врождённого иммунитета, т. к. молекулы адгезии, относящиеся к селектинам и интегринам, играют специализированную роль в процессе таксиса лейкоцитов в участок воспаления и передаче различных клеточных сигналов, а молекулы CD54 обеспечивают адгезию нейтрофилов и моноцитов к сосудистому эндотелию с последующей их экстравазацией и миграцией в очаг воспаления. Кроме того, ЭПС, выделенный из *P.nigrifaciens*, увеличивал относительное количество моноцитов, синтезирующих IL-12, и повышал цитотоксический потенциал NK-клеток, усиливая их дегрануляцию (экспрессию мембранного CD107a), внутриклеточный синтез IFN- γ и увеличивая экспрессию молекул CD25, CD69, HLA-DR, CD11b и CD54 [31]. В связи с тем, что NK-клеткам принадлежит важнейшая роль в иммунологическом надзоре, а ЭПС морских бактерий *P.nigrifaciens* являются индукторами NK-клеточной активности, представляется перспективным дальнейшее исследование этих гликополимеров и создание на их основе фармакологических противовирусных и противоопухолевых препаратов.

Противоопухолевые эффекты ЭПС. Онкологические заболевания являются второй из основных причин смерти во все мире. Ежегодно болезнь уносит свыше 12 млн человек. Значительную часть этого бремени (около 63%) несут страны с низким и средним уровнем дохода [16, 32]. Ожидается, что в ближайшие 20 лет число новых заболевших возрастёт примерно на 70%. Применяемые в настоящее время противоопухолевые препараты отличаются от других лекарств высокой агрессивностью и сильным местно-раздражающим действием, в связи с чем ведётся поиск новых эффективных соединений с минимальным побочным действием.

В последние десятилетия достаточно интенсивно исследуются противоопухолевые свойства ЭПС из морских бактерий как свободноживущих, так и ассоциированных с другими гидробионтами. Полученные к настоящему времени результаты вселяют надежду на то, что ЭПС морских бактерий послужат основой для создания новых лекарственных препаратов с минимальными побочными эффектами.

До настоящего времени не разработаны методы блокирования процесса метастазирования. Так, быстрым метастазированием отличается немелкоклеточная карцинома лёгких [33]. В этом вопросе необходимы новые терапевтические стратегии и новые агенты, которые бы действовали на процесс перемещения раковых клеток из места образования опухоли в другие части организма. В связи с этим представляет интерес работа R. Cao et al. [34]. Авторы использовали в экспериментах ЭПС11 из морской бактерии *Bacillus* sp., изолированной из морских донных отложений, и клеточную линию A549 (клетки карциномы лёгкого).

Аноикис — апоптоз, обусловленный нарушением связи клеток с экстрацеллюлярным матриксом, в связи с чем усиление этого процесса может быть новой перспективной стратегией борьбы с метастазированием [35]. ЭПС11 индуцировал аноикис путём подавления экспрессии III-тубулина и влиял на пролиферацию и адгезию культуры клеток. Полисахарид дозозависимо разрушал нитевидные структуры (филоподии) опухолевых клеток. Филоподии — длинные тонкие выступы, помогающие здоровым клеткам перемещаться внутри ткани. В раковых клетках эти органеллы появляются в избытке, обеспечивая их адгезию, миграцию и инвазию [36, 37]. Число филоподий определяет инвазивность опухолевых клеток [38]. ЭПС11 ингибировал миграцию опухолевых клеток, разрушая филоподии. Другим механизмом противоопухолевого действия полисахарида было ингибирование III-тубулина, экспрессия которого связана с развитием агрессивного клеточного фенотипа, устойчивого к аноикису и оксидативному стрессу. Этот же полисахарид эффективно ингибировал процесс метастазирования клеток остеосаркомы в лёгкие [34]. Жизнеспособность опухолевых клеток после инкубации с ЭПС11 составила 55% при дозе 100 мкг/мл, 72% — при 50 мкг/мл, 79% — при 25 мкг/мл и 82% — при 12,5 мкг/мл. Авторы установили, что для проявления противоопухолевого действия в основной цепи глюкоана необходимы β -(1→3) связи и дополнительные β -(1→6) точки ветвления. Таким образом, ЭПС 11 является перспективным кандидатом для разработки противоопухолевых лекарственных препаратов.

На модели опухолевых клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) была ис-

следована эффективность ЭПС из *Bacillus marinus*, выделенной из морских донных отложений [16]. Молекулярная масса основной фракции полисахарида составляла 500 kDa, моносахаридный состав соединения был представлен глюкозой и глюкуроновой кислотой в молярном соотношении 3:1, соответственно, соединённых β -(1→4) связями. Химическая структура полисахарида выглядела следующим образом: [Glc- β -(1→4)-Glc- β -(1→4)-Glc- β -(1→4)-GlcA]_n.

Другие авторы связывают противоопухолевое действие морских ЭПС с их мощным антиоксидантным и противовоспалительным потенциалом [39]. Авторы исследовали противоопухолевое действие полисахарида из *Bacillus amyloliquefaciens* 3MS2017, выделенной из морских донных отложений. Кислый ЭПС содержал 12,3% уроновых кислот. Молекулярное соотношение глюкозы, галактозы и глюкуроновой кислоты составляло 1,6:1,0:0,9, соответственно. В качестве модели были использованы клеточные культуры MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека), PC3 (рак предстательной железы человека), а также асцитной карциномы Эрлиха (ЕАС). ЭПС оказал сильное избирательное ингибирующее действие на клетки рака молочной железы (65,2% погибших клеток при IC₅₀=70 мкг/мл и IC₉₀=127,4 мкг/мл). Мощный эффект отмечен на клетках ЕАС. В данном случае воздействие ЭПС привело к гибели 81,77±0,75% клеток при 2,80±0,95% в контроле. Авторы связывают значительный противоопухолевый эффект, во-первых, с мощным антиоксидантным действием ЭПС и, во-вторых, с противовоспалительным действием (ингибирование экспрессии NO₂ и COX₂, в меньшей степени — COX-1).

Остеосаркома — злокачественная опухоль костей сопровождается частым метастазированием в лёгкие. D. Neumann et al. [40] провели исследование противоопухолевого эффекта по отношению к остеосаркоме трёх высокосульфатированных производных ЭПС с различной молекулярной массой (4,8 и 15 kDa). Исходный полисахарид GY785EPS был получен из глубоководной гидротермальной бактерии *Alteromonas infernus* [41, 42]. Содержание серы в производных исходного полисахарида составляло свыше 10%. На клеточных линиях остеосаркомы было установлено, что только производное EPS15kDa ингибировало инвазивность клеток остеосаркомы, но не оказывало влияния на клеточный цикл. Это же производное было мощным ингибитором миграции клеток остеосаркомы, незначительно увеличивало уровень MMP-9 и более высоко — тканевой ингибитор TMP-1. В экспериментах *in vivo* соединение значительно ингибировало образование метастазов в лёгких мышей. При ретроорбитальной инъекции мышам клеток мышинной остеосаркомы,

обработанных EPS15kDa, у животных снижалось количество метастазов и было на 40% меньше, чем у мышей, которым вводили необработанные полисахаридом клетки опухоли или обработанные гепарином клетки. Выживаемость животных, получивших обработанные полисахаридом клетки, составила 70%, в то время, как в контрольной группе выжило только 14% животных (срок наблюдения составил 69 дней).

С. Ruiz-Ruiz et al. [43] получили ЭПС из галофильной бактерии *Halomonas stenophila* (штамм B100). Авторы позиционируют это соединение в качестве полисахарида, оказывающего сильное избирательное проапоптотическое действие на Т-клетки линии лимфобластной лейкемии. Нормальные Т-клетки были резистентны к действию полисахарида. Клетки, выделенные из крови пациента с лейкемией, были чувствительны к индуцированному полисахаридом EPSB100 апоптозу. В связи с получением таких результатов авторы предлагают провести скрининг среди ЭПС галофильных бактерий для выявления наиболее сильных индукторов апоптоза лейкоэмических клеток.

Наиболее распространённой первичной злокачественной опухолью печени является гепатоцеллюлярная карцинома. S. M. Abdelnasser et al. [44] получили новый низкомолекулярный EPS-6 из *Bacillus megaterium* (донные отложения в Средиземном море), высокотоксичный ($IC_{50}=218$ мкг/мл) для клеток гепатоцеллюлярной карциномы Нер-2. Такую высокую токсичность авторы объясняют наличием в структуре полисахарида сульфатов и урановых кислот.

Приведённые материалы свидетельствуют о значительном противоопухолевом потенциале экзополисахаридов морских бактерий.

Противовирусное действие ЭПС из морских бактерий. Невысокая эффективность традиционных методов терапии вирусных инфекций диктует необходимость поиска новых препаратов, не только способствующих регуляции функций иммунной системы, но и избирательно воздействующих на процессы репликации вируса. В связи с этим в разных странах проводятся исследования противовирусных свойств природных полисахаридов, в том числе и ЭПС морских бактерий [45, 46].

Морские ЭПС могут либо ингибировать репликацию вируса воздействием на его жизненный цикл на разных этапах, либо усиливать антивирусный иммунный ответ хозяина для ускорения процесса элиминации возбудителя. Большие надежды в этом плане возлагают на ЭПС, полученные из бактерий экстремофилов, поскольку они способны производить новые неизвестные метаболиты, которые, как полагают, могут иметь уникальные характеристики (необычный химический состав, физико-химические свойства, струк-

туру), иной механизм действия, чем существующие противовирусные препараты.

В качестве моделей для изучения противовирусных свойств ЭПС часто используют вирусы семейства *Herpesviridae* (HSV), имеющие высокую социальную значимость, что определяется не только широким распространением герпесвирусной инфекции и уровнем летальности, но и особенностями патогенеза и разнообразием клинических проявлений. Герпесвирусы избегают воздействия иммунной защиты организма. Поэтому пути поиска новых противовирусных препаратов связаны не только с разработкой эффективных химических соединений, но и с определением иммунологических мишеней для стимуляции клеточного иммунитета.

Такие природные ЭПС (A1 и A2) и их производные были получены М. Matsuda et al. [47] из морских бактерий *Pseudomonas* sp. WAK-1, выделенных из бурой водоросли *Undaria pinnatifida*. Молекулярная масса A1 и A2 составляла 26 и 100 kDa, соответственно. В состав производных A1 и A2 — A1S и A2S — входили компоненты GalNAc : GlcUA : пируват: сульфат в молярном соотношении 3:1:0,5:7 и галактоза:глюкоза:сульфат в молярном соотношении 2:1:10, соответственно. ЭПС A1 и A2 не обладали противовирусной активностью по отношению к ВИЧ-1. ЭПС A2 защищал клетки от HSV-2. Кроме того, оба производных обладали активностью по отношению к вирусу гриппа, сравнимой с таковой рибавирина.

Несколько позже А. Arena et al [45] выделили ЭПС из бактерий *Bacillus licheniformis*, полученных из воды горячего морского источника. Добавление к мононуклеарным клеткам периферической крови человека этого ЭПС (характеристика которого представлена в работе В. Nicolaus et al. [48]) приводило к снижению репликации вируса HSV-2 в клетках. Так, в присутствии ЭПС в дозах 300, 200 и 100 мкг/мл отмечено 3×10^4 PFU/ml (бляшкообразующие единицы/мл), 8×10^4 PFU/ml и $1,7 \times 10^5$ PFU/ml, соответственно. В необработанных клетках этот показатель составил 2×10^5 PFU/ml. В обработанных ЭПС клетках отмечен высокий уровень продукции цитокинов: IFN γ , IL-12, IFN α , TNF α , IL-18, IL-4.

С. Gugliandolo et al. [46] было исследовано противовирусное действие ЭПС, полученных из *B. licheniformis* (штамм E-14) и *Geobacillus thermophilus* B3-72 и B3-15. Второй штамм был более термофильным, оптимум роста — 65°C. ЭПС препятствовали репликации HSV-2 в мононуклеарных клетках периферической крови человека, но не в линии клеток WISH (Wistar Institute Susan Hayflic), что указывает на то, что в механизмах противовирусной активности участвует клеточный иммунитет. Все ЭПС индуцировали высокий уровень продукции клетками периферической

крови человека цитокинов Th1-типа, тогда как продукция цитокинов Th2-типа не увеличивалась. Эти ЭПС способны стимулировать иммунный ответ и тем самым усиливать противовирусную иммунную защиту, действуя как иммуномодуляторы. В связи с этим авторы полагают, что в будущем эти ЭПС можно будет применять при вирусной инфекции у иммунокомпрометированных лиц. Приведённые примеры свидетельствуют о том, что ЭПС из морских бактерий способны ингибировать репликацию HSV-2 путём увеличения экспрессии специфических противовоспалительных цитокинов, а также поляризации иммунного ответа в направлении Th1. Переключение на продукцию цитокинов Th1 типа представляет новый терапевтический подход к усилению иммунного надзора.

Обнаружены ЭПС, оказывающие защитный эффект на клетки по отношению к вирусу гриппа [16]. Авторы получили ЭПС из *Bacillus marinus*. Основная цепь полисахарида была построена из остатков (1→4)-связанной глюкозы и глюкуроновой кислоты. Он обладает способностью к удалению свободных радикалов и противоопухолевой активностью. Молекулярная масса основной фракции ЭПС составляла 500 kDa, фракция содержала сульфатные группы (20,2%) и состояла из остатков глюкозы и глюкуроновой кислоты в молярном соотношении 3:1, соответственно.

На эпителиоподобной клеточной линии почки собаки было исследовано противовирусное действие как нативного ЭПС, так и основной фракции по отношению к вирусу гриппа H1N1. В результате исследования цитотоксичности образцов было установлено, что нативный ЭПС можно использовать в качестве антивирусного средства без очистки. Ингибирующий эффект образцов по отношению к вирусу гриппа H1N1 в концентрациях 10, 20 и 40 мкг/мл исследовали методом ингибирования бляшкообразующей активности. Ингибирующий эффект нативного ЭПС при указанных концентрациях составил 7, 16,6 и 32%, соответственно. Ингибирующий эффект основной фракции составил 6, 15 и 31,4%. Этот результат (несколько более высокий эффект нативного ЭПС) согласуется с данными других авторов, показавших высокую противовирусную активность и низкую токсичность для клеток сульфатированных полисахаридов из других источников.

Противовирусная активность соединений зависит как от степени сульфатирования, так и от молекулярной массы. При этом полисахариды, содержащие большое количество остатков уроновой кислоты, проявляют низкую противовирусную активность. Для противовирусной активности важно также определённое положение сульфатных групп [49]. Известно, что сульфатированные экзополисахариды препятствуют проникно-

ванию вирусов в клетку-хозяина и ингибируют ретровирусные обратные транскриптазы [47, 50].

Антибактериальное и ингибирующее действие на формирование биоплёнок. Известно антимикробное действие полисахаридов, полученных из гидробионтов (водорослей, беспозвоночных) [51]. В последние годы положительную оценку антибактериального действия получают экзополисахариды морских бактерий. Так, А. К. El Essawy et al. [51, 52] исследовали антимикробное действие ЭПС, полученного из морского микроорганизма *Klebsiella* sp., изолированного из морских донных отложений. Моносахаридный состав этого ЭПС был представлен галактозой (16%), фруктозой (20%), глюкозой (32%), фукозой (22%) и уроновой кислотой (10%). При исследовании антибактериальной и антифунгальной активности нативного и модифицированного (сульфатированного) ЭПС по отношению к тест-бактериям (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) и грибу (*Candida albicans*) установлено, что оба ЭПС подавляли рост *E.coli* и *S.aureus*, но не ингибировали рост *C.albicans*. Наибольший размер зоны ингибирования роста *E.coli* (22 мм) и *S.aureus* (30 мм) давал нативный ЭПС. Сульфатированный ЭПС обуславливал образование зоны ингибирования *E.coli* — 20 мм и *S.aureus* — 22 мм. Минимальная ингибирующая концентрация нативного и сульфатированного полисахаридов, обеспечивающая наибольшую зону ингибирования роста обоих микроорганизмов, составляла 15 мг/дл. Авторы высоко оценивают ЭПС из *Klebsiella* sp. как сильное антибактериальное средство против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

В настоящее время считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в виде биоплёнок [54, 55]. Это — инфекции сердечных клапанов, раневых поверхностей, кишечные инфекции, гингивиты, стоматиты, образование зубного камня, бактериальные и грибковые отиты, и пр. В связи с высокой агрессивностью патогенных микроорганизмов по сравнению с комменсалами происходит преимущественное заселение ими любых инородных тел, вводимых в организм человека. Биоплёнки образуются на постоянных катетерах, контактных линзах, эндопротезах, эндоскопах и пр. [54]. Результаты исследований, опубликованные в последние годы, свидетельствуют о том, что учёные только приблизились к пониманию фундаментальных принципов феномена плёнокообразования. Микробиология в этом вопросе находится пока на этапе эмпирического накопления знаний. Известно, что микроорганизмы в составе биоплёнки по сравнению с планктонными формами отрицательно влияют на течение хронических воспалительных заболеваний, поскольку они обладают высоким уров-

нем толерантности к антителам, антибиотикам, ксенобиотикам, антисептикам, дезинфектантам и фагоцитам [56]. Всё это диктует необходимость поиска и разработки новых эффективных средств и способов воздействия на биоплёнки.

Известно, что доля ЭПС в биоплёнке может составлять примерно 50–90% от общего количества органического вещества [57]. Состав и количество ЭПС зависит от типа микроорганизма, возраста биоплёнок и условий окружающей среды, в которых существует биоплёнка (уровень кислорода и азота, влажность окружающей среды, свойства поверхности и адгезионные свойства бактерий) [58].

P. Jiang et al. [58] показали, что ЭПС A101, полученный из супернатанта морской бактерии *Vibrio* sp. QY101, продуцирующей альгинат-лиазу, выделенной из распадающегося таллома бурой водоросли *Laminaria*, не только препятствует образованию биоплёнки многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, но и разрушает биоплёнки некоторых бактерий. Авторы позиционировали это соединение как первый ЭПС двойного действия. Было показано, что ЭПС A101 ингибировал образование биоплёнки *Pseudomonas aeruginosa*. Авторы предположили, что причиной этого является альгинат-лиаза, однако вскоре было показано, что очищенный фермент из этого ЭПС такими свойствами не обладал. Дальнейшие исследования позволили авторам предположить, что компонент, ингибирующий образование биоплёнки, является полисахаридом. Практически важным является то, что ЭПС A101 усиливал способность антибиотиков разрушать биоплёнку. Было показано, что использование только амикацина не разрушало плёнку *P. aeruginosa*. Однако в присутствии ЭПС A101 (100 мкг/мл) происходило её полное уничтожение. Экзополисахарид A101 также ингибировал адгезию бактерий к поверхности клеток и межклеточную адгезию, что является очень важным обстоятельством при формировании биоплёнки.

В составе биоплёнки часто бывает несколько разных микроорганизмов, при этом наблюдаются скопления бактерий разной величины. Оказалось, что в присутствии ЭПС A101 агрегаты *P. aeruginosa* и *S. aureus* резко уменьшаются в размерах. Авторы позиционируют ЭПС A101 как возможный мощный терапевтический инструмент в лечении инфекций, вызванных этими микроорганизмами.

Таким образом, воздействие ЭПС, полученного из *Vibrio* sp., может быть направлено на блокирование механизмов адгезии бактерий к поверхности, разрушение полимерного матрикса, нарушение связей между микроорганизмами и клетками. Эффективным оно может быть и в слу-

чае сочетания его с бактерицидными агентами, в частности, с антибиотиками.

Близкие результаты были получены F. Brian-Jaisson et al. [59] при исследовании антибиоплёночного действия трёх ЭПС (Sol-EPS, LB-EPS, TB-EPS), выделенных из планктонных микроорганизмов и биоплёнки *Pseudoalteromonas ulvae* TC14, грамотрицательной пигментированной бактерии, выделенной с поверхности бурой водоросли *Ulva latuca*. Из ЭПС были выделены две полисахаридные фракции — кислая и нейтральная. Кислая фракция была получена из TB-EPS, прочно связанного с бактериальной клеткой (капсульное вещество), и ингибировала с дозозависимым эффектом образование биоплёнки. Основными составляющими этой фракции были два глюканоподобных полисахарида. Роль EPS фракций в природе возможно связана с функцией антиобрастания.

Супернатанты каждого вида бактерий содержат разные антиплёночные молекулы, функционирующие выборочно в зависимости от вида микроорганизма. Доказательством этого является работа R. Pара et al. [60], в которой авторы исследовали антибиоплёночный эффект супернатантов бактерий, адаптированных к холоду. Одной из стратегий выживания полярных бактерий в экстремальных условиях авторы считают производство метаболитов с антиплёночным действием, что используется микроорганизмами как оружие конкуренции с другими микроорганизмами за источники питания в экстремальной ситуации.

Действие полисахаридов обусловлено конкурентным ингибированием мультивалентных углеводно-белковых взаимодействий [61]. Антиплёночные полисахариды могут блокировать лектины или сахарсвязывающие белки, находящиеся на поверхности бактерий, или блокировать концевые адгезины фимбрий и пилей. Некоторые исследования показывают, что полисахариды могут действовать как сигнальные молекулы, которые модулируют экспрессию генов бактерий-реципиентов [62]. Антиплёночные ЭПС могут также изменять физические свойства абиотических поверхностей [63]. Предварительная обработка таких поверхностей ЭПС снижает способность *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* образовывать плёнки. Также антиплёночные ЭПС могут обладать способностью воздействовать на физические свойства поверхности бактериальных клеток. Например, ЭПС из *Bacillus licheniformis* снижал гидрофобность клеточной поверхности *E. coli* [64]. Это приводило к снижению уровня адгезии бактериальных клеток и уменьшению аутоагрегации.

Мы привели только краткие сведения об антибиоплёночных эффектах ЭПС морских бактерий в связи с тем, что этот вопрос получил освещение в нашей более ранней работе [50].

Влияние ЭПС на липидный и углеводный обмен.

Ведущее место среди причин развития сердечно-сосудистых заболеваний занимает атеросклероз, сопровождающийся, как правило, дислипидемией. Около 30% пациентов с дислипидемией нечувствительны к статинам, которые наиболее часто применяются при этой болезни. Кроме того, в отдельных случаях статины оказывают нежелательное действие на организм, а ряду пациентов они противопоказаны. Ряд побочных эффектов вызывают и антидиабетические препараты. В связи с этим остаётся актуальным поиск новых безвредных и эффективных средств гиполлипидемической и антидиабетической терапии [65].

Известно, что полисахариды из гидробионтов могут регулировать липидный и углеводный обмен [66]. В последнее время появились работы, в которых представлены результаты экспериментальных исследований антидислипидемического и антидиабетического действия ЭПС из морских бактерий. Несмотря на то, что таких работ пока еще немного, они свидетельствуют о большом терапевтическом потенциале этих соединений [67, 68]. Большой интерес в этом плане представляет работа М. А. М. Ghoneim et al. [68], которые исследовали действие ЭПС из микроорганизма *Bacillus subtilis* при сердечно-сосудистых нарушениях у крыс с экспериментальным диабетом. Известно, что значительную роль в патогенезе сахарного диабета играют метаболические нарушения и окислительный стресс. Поскольку ЭПС из морских бактерий обладают сильным антиоксидантным действием, их применение при диабете может быть эффективным. Бактериальный штамм был выделен из морского грунта под манграми. Штамм NRC-108, продуцирующий значительное количество ЭПС, был идентифицирован на основе морфологических, физиологических и биохимических характеристик с определением последовательности 16s рРНК. Показатель токсичности ЭПС составил 600 мг/кг. В состав полисахарида входили маннуронозная и глюкуронозная кислоты, глюкоза, галактоза и манноза в молярном соотношении 1,6:1,5:1,0:2,3:1,4, соответственно. Молекулярная масса соединения составила $1,66 \times 10^4$ г/моль. При определении липидного спектра сыворотки крови у подопытных крыс было установлено, что у животных с экспериментальным диабетом, индуцированным стрептозотоцином, отмечается увеличение уровня общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и снижение липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) по сравнению с интактными животными. У крыс, леченных ЭПС, отмечено снижение уровня ОХ, ЛПНП, ЛПОНП и ОЛПНП и повышение ЛПВП. У крыс с диабетом также был повышен уровень мо-

лекул адгезии VCAM и ICAM по сравнению с контролем. Введение ЭПС таким животным снижало уровень этих молекул.

Как известно, гидроксильные радикалы являются наиболее реакционно способными и иницируют значительное повреждение клеток *in vitro* и *in vivo* [69]. Гидроксильные радикалы и ROS могут быть решающими факторами в повреждении β -клеток поджелудочной железы. М.А.М. Ghoneim et al. [68] на крысах с диабетом показали значительное уменьшение показателя концентрации радикалов DPPH в крови у животных, получавших ЭПС. В. В. Вельков исследовал динамику уровня тропонина — маркера миокардиального некроза [70]. Диабет вызывает прогрессирующее повреждение миокарда, что увеличивает степень риска у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. У крыс с диабетом, получавших ЭПС, уровень тропонина был значительно снижен по сравнению с животными с моделью диабета, не получавшими ЭПС ($34,65 \pm 2,59$ и $47,27 \pm 2,18$ пг/мл, соответственно). Кроме того ЭПС из *B. subtilis* снижает уровень глюкозы в крови у диабетических животных (с $206,55 \pm 6,24$ до $82,7 \pm 3,08$ пг/мл, соответственно) и повышает содержание инсулина в их крови, что может быть обусловлено подавлением глюконеогенеза в печени и сопровождается подавлением липолиза в жировой ткани [71]. И, наконец, у крыс с экспериментальным диабетом ЭПС значительно уменьшал дегенеративные изменения в миокарде и тканях аорты.

Приведённые материалы позволяют считать, что ЭПС морских бактерий обладают большим потенциалом в качестве средств, нормализующих липидный и углеводный обмен.

ЭПС морских микроорганизмов в восстановлении костной и хрящевой ткани. Морские микроорганизмы представляют собой неисчерпаемый источник ЭПС, которые можно использовать для лечения заболеваний, связанных с разрушением хрящевой или костной ткани, раневыми процессами [12, 72, 73]. Так, из морского микроорганизма *Vibrio diabolus*, выделенного из полихет *Alvenella pompejana*, получен ЭПС HE 800. Полисахарид содержал равное количество гиалуроновой кислоты и гексозаминов (N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин). Коммерческое название этого биополимера — Гиалурифт® [8]. Эффективность этого высокомолекулярного соединения оценивали в экспериментах с восстановлением целостности кости у крыс Vistar. В качестве контроля был использован коллаген. Испытуемые вещества помещали в отверстие, сделанное в левой теменной кости животных. В отверстие в правой теменной кости не закладывали никаких препаратов. У 95% крыс с ЭПС регистрировалось полное заживление костного дефекта

через 15 дней после начала эксперимента. Анатомия дефекта (трабекулярная и корковая структура) была полностью восстановлена. У животных, обработанных коллагеном, и не получивших какого бы то ни было лечения, значительных признаков выздоровления к этому сроку не было примерно у 30% животных. Авторы объясняют эти результаты доказанными ими *in vitro* эффектами — улучшением структурирования коллагена в соединительной ткани и образованием фибробластов во внеклеточном матриксе. Данные результаты свидетельствуют о возможности создания коллагеновой ткани для кожной или хрящевой трансплантации [72], а бактериальные ЭПС представляют собой значительный потенциал в клеточной терапии и тканевом инжиниринге.

Заключение

Морская биотехнология является новой дисциплиной, направленной на промышленное использование природных ресурсов океана. Особенно это важно для медицины, т. к. морские биоресурсы представляют собой богатый источник биологически активных веществ, который может быть использован для разработки новых классов лекарственных препаратов, БАД к пище, продуктов функционального питания, косметических средств, материалов для лечения ран и пр. Биологические вещества, полученные из морских источников, как правило, более разнообразны и активны, чем их аналоги из наземных источников, поскольку гидробионты обитают в крайне разнообразной внешней среде и, в связи с этим, вырабатывают высокоактивные защитные соединения. Большое значение в этом процессе имеет также более длительная эволюция многих групп морских обитателей, позволившая развить в них чрезвычайно широкий спектр биохимических адаптаций.

Все это побудило авторов настоящей работы обратить внимание российских биологов, врачей и биотехнологов на морские микроорганизмы, в частности, на бактерии, которым, на наш взгляд, в

последнее десятилетие в нашей стране уделяется недостаточное внимание. Потенциал морских бактерий и их экзополисахаридов остаётся в значительной степени неисследованным, хотя морские бактерии в настоящее время считаются эффективными производителями биологически активных и/или химически новых соединений. В связи с возможностью культивирования их в биореакторах различной емкости не возникает проблем с их производством. Биомасса этих гидробионтов в морях довольно значительна, и за рубежом исследования потенциальных возможностей ЭПС морских бактерий весьма быстро развиваются.

В обзоре в сжатой форме представлены основные направления биомедицинских исследований экзополисахаридов, полученных из морских бактерий. Океаны и моря являются источником новых микроорганизмов с новыми, часто неожиданными механизмами действия. Медленное продвижение на фармацевтический рынок лекарственных препаратов на их основе связано со многими трудностями, среди которых имеет место недостаточно развитое междисциплинарное сотрудничество фармакологов, биотехнологов, молекулярных биологов, химиков, генетиков, экологов и врачей различных специальностей.

Требуют дальнейшего развития исследования, связанные с использованием ЭПС в качестве безвредных и эффективных адъювантов вакцин, антимикробных средств, компонентов БАД к пище, продуктов функционального питания, пребиотиков.

По-видимому, в дальнейшем усилия учёных должны быть направлены на получение низкомолекулярных фрагментов ЭПС, оценку их способности связываться с различными рецепторами клеток организма для достижения того или другого терапевтического эффекта. После этого перспективные соединения могут быть синтезированы. Имеются все основания надеяться, что препараты из морских бактерий займут достойное место в широком ассортименте лекарственных и парафармацевтических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H., Prinsep M.R. Marine natural products. Nat Prod Rep 2016; 33 (3): 382–431. doi: 10.1039/c5np00156k.
2. Михайлов В.В. Морская микробиология в ТИБОХ ДВО РАН. Вестник ДВО РАН. — 2005. — 4. — С. 145–151. / *Mikhajlov V.V. Morskaya mikrobiologiya v TIBOKH DVO RAN. Vestnik DVO RAN* 2005; 4: 145–151. [in Russian]
3. Михайлов В.В., Пивкин М.В. Изучение морских бактерий и грибов. Вестник ДВО РАН. — 2014. — № 1. — С. 149–156. / *Mikhajlov V.V., Pivkin M.V. Izuchenie morskikh bakterij i gribov. Vestnik DVO RAN* 2014; 1: 149–156. [in Russian]
4. Freitas F., Alves V., Reis M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends Biotechnol 2011; 29 (8): 388–398.
5. Manivasagan P., Kim S.K. Extracellular polysaccharides produced by marine bacteria. Adv Food Nutr Res 2014; 72: 79–94. doi: 10.1016/B978-0-12-800269-8.00005-1
6. Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. Terrestrial and oceanic components primary production of the biosphere. Integrating 1998; 281: 237–240. doi:10.1126/science.281.5374.237
7. Casillo A., Lanzetta R., Parrilli M., Corsaro M.M. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. Mar Drugs 2018; 16 (2): 69–78. doi:10.3390/md16020069
8. Senni K., Pereira J., Gueniche F. et al. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. Mar Drugs 2011; 9: 1664–1681. doi:10.3390/md9091664
9. Heissenberger A., Leppard G.G., Hernd G.J. Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. Appl Environ Microbiol. 1996; 62: 4521–4528.
10. Harutoshi T. Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications 2013; 1: 515–538. doi:10.5772/50839
11. Caliceti P., Salmaso S., Bersani S. Polysaccharide-based anticancer prodrugs. In Macromolecular anticancer therapeutics ed. Reddy, L., H. and Couvreur, P. New York, NY: Humana Press Inc 2010; 163–219.

12. *Moscovici M.* Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol* 2015; 6: 1012–1022. doi: 10.3389/fmicb.2015.01012.
13. *Polí A., Anzelmo G., Nicolaus B.* Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar Drugs* 2010; 8 (6): 1779–802. doi: 10.3390/md8061779.
14. *Delbarre-Ladrat C., Sinquin C., Lebellenger L. et al.* Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Front Chem* 2014; 2: 85. doi: 10.3389/fchem.2014.00085
15. *Finore I., Di Donato P., Mastascusa V. et al.* Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. *Mar Drugs* 2014; 12 (5): 3005–3024. doi: 10.3390/md12053005
16. *Osama H., El Sayed, Abd El Kader et al.* Isolation, characterization and biological activities of exopolysaccharide produced by *Bacillus marinus*. *Der Pharma Chemica* 2015; 7 (2): 200–208.
17. *Wu S., Liu G., Jin W. et al.* Antibiofilm and anti-infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2016; 7: 102. doi: 10.3389/fmicb.2016.00102
18. *Медведев С.С.* Физиология растений. СПб. БХВ-Петербург, 2012. — 512 с. / *Medvedev S.S.* Fiziologiya rastenij. Spb. BKHV-Peterburg 2012; 512. [in Russian]
19. *Mohsen M. S., Asker, Manal G. et al.* Inhibitory effect of exopolysaccharide from *Achromobacter piechaudii* NRC2 against cyclooxygenases and acetylcholinesterase with evaluation of its antioxidant properties and structure elucidation. *Der Pharmacia Lettre* 2015; 7 (4): 129–141.
20. *Hardas S.S., Sultana R., Clark A.M. et al.* Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain. *Redox Biol* 2013; 1: 1: 80–85. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.002
21. *Duh P.D., Tu Y.Y., Yen G.C.* Antioxidant activity of water extract of harngiyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 1999; 32: 269–277.
22. *Tsiapali E., Whaley S., Kalbfleisch J. et al.* Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radic Biol Med* 2001; 30 (4): 393–402.
23. *Priyanka P., Arun A.B., Ashwini P. et al.* Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18. *Carbohydr Polym* 2015; 126: 215–221. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.03.017
24. *Pawar R., Mohandass C., Sivaperumal E. et al.* Epiphytic marine pigmented bacteria: A prospective source of natural antioxidants. *Braz J Microbiol* 2015; 46 (1): 29–39. doi: 10.1590/S1517-838246120130353
25. *Lin M.H., Yang Y.L., Chen Y.P. et al.* A novel exopolysaccharide from the biofilm of *Thermusaquaticus* YT-1 induces the immune response through Toll-like receptor 2. *Biol Chem.* 2011; 286 (20): 17736–17745. doi: 10.1074/jbc.M110.200113
26. *Yu L., Sun G., Wei J.* Activation of macrophages by an exopolysaccharide isolated from Antarctic *Psychrobacter* sp. B-3. *Chinese J. of Oceanology and Limnology* 2016; 34: 5: 1064–1071.
27. *Bai Y., Zhang P., Chen G. et al.* Macrophage immunomodulatory activity of extracellular polysaccharide (PEP) of Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. S-5. *International Immunopharmacology* 2012; 12: 4: 611–617.
28. *Courtois A., Berthou C., Guézennec J., Boisset C. et al.* Exopolysaccharides isolated from hydrothermal vent bacteria can modulate the complement system. *PLoS One* 2014; 9 (4): e94965. doi: 10.1371/journal.pone.0094965
29. *Zanchetta P., Lagarde N., Guezennec J.* A new bone-healing material: a hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72 (1): 74–79.
30. *Смолина Т.П., Беседнова Н.Н.* Влияние гликополимеров морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* на экспрессию молекул адгезии лейкоцитами человека. *Здоровье. Медицинская экология.* Наука. — 2014. — Т. 3. — № 57. — 49–50. / *Smolina T.P., Besednova N.N.* Vliyaniye glikopolimerov morskikh bakterij *Pseudoalteromonas nigrifaciens* na ekspressiyu molekul adgezii lejkotsitami cheloveka. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya.* Nauka 2014; 3: 57: 49–50. [in Russian]
31. *Смолина Т.П., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н.* Активация клеток врожденного иммунитета человека липополисахаридом и экстрацеллюлярным полисахаридом морских бактерий. Антибиотики и химиотерапия. — 2017. — № 7–8: С. 3–7. / *Smolina T.P., Zaporozhets T.S., Besednova N.N.* Aktivatsiya kletok vrozhdennogo immuniteta cheloveka lipopolisariidom i ekstratsellyulyarnym polisakharidom morskikh bakterij. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2017; 7–8: 3–7. [in Russian]
32. *ВОЗ.* Информационный бюллетень 2017; 2: 95: 85–164. / *VOZ.* Informationsnyy byulleten' 2017; 2: 95: 85–164
33. *Goldstraw P., Ball D., Jett J.R. et al.* Non-smallcell lung cancer. *Lancet* 2011; 378: 1727–1740.
34. *Cao R., Jin W., Shan Y. et al.* Marine bacterial polysaccharide EPS11 inhibits cancer cell growth via blocking cell adhesion and stimulating anoikis. *Mar Drugs* 2018; 16 (3): 85–96. doi: 10.3390/md16030085.
35. *Gilmore A.P.* Anoikis. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1473–1477. doi:10.1038/sj.cdd.4401723
36. *Sanders T.A., Llagostera E., Barna M.* Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature* 2013; 497 (7451): 628–632. doi: 10.1038/nature12157
37. *Jacquemet G., Hamidi H., Ivaska J.* Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 36: 23–31. doi: 10.1016/j.ceb.2015.06.007
38. *Jacquemet G., Hamidi H., Ivaska J.* Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Current Opinion in Cell Biology* 2015; 36: 23–31.
39. *El-Newary S.A., Ibrahim A.Y., Asker M.S. et al.* Production, characterization and biological activities of acid exopolysaccharide from marine *Bacillus amylolique faciens* 3MS 2017. *Asian Pac J Trop Med* 2017; 10 (7): 652–662. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.005
40. *Heymann D., Ruiz-Velasco C., Chesneau J. et al.* Anti-Metastatic Properties of a Marine Bacterial Exopolysaccharide-Based Derivative Designed to Mimic Glycosaminoglycans. *Molecules* 2016; 21 (3): 309. doi: 10.3390/molecules21030309
41. *Roger O., Kervarec N., Ratiskol J. et al.* Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydr Res* 2004; 339 (14): 2371–2380.
42. *Chopin N., Sinquin C., Ratiskol J. et al.* A Direct Sulfation Process of a Marine Polysaccharide in Ionic Liquid. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 508–656. doi: 10.1155/2015/508656
43. *Ruiz-Ruiz C., Srivastava G.K., Carranza D. et al.* An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonasstenophila* strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukemia cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 89 (2): 345–355. doi: 10.1007/s00253-010-2886-7
44. *Abdelnasser S.M., Yahya S.M., Mohamed W.F. et al.* Antitumor exopolysaccharides derived from novel marine bacillus: isolation, characterization aspect and biological activity. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18 (7): 1847–1854. doi: 10.22034/apjcp.2017.18.7.1847
45. *Arena A., Maugeri T.L., Pavone B. et al.* Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopoly saccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *Int Immunopharmacol* 2006; 6 (1): 8–13. doi: 10.1016/j.intimp.2005.07.004
46. *Gugliandolo C., Spano A., Maugeri T.L. et al.* Role of bacterial exopolysaccharides as agents in counteracting immune disorders induced by herpes virus. *Microorganisms* 2015; 3 (3): 464–483. doi: 10.3390/microorganisms3030464
47. *Matsuda M., Shigeta S., Okutani K.* Antiviral Activities of Marine *Pseudomonas* Polysaccharides and Their Oversulfated Derivatives. *Mar Biotechnol* (NY) 1999; 1: 68–73.
48. *Nicolaus B., Panico A., Manca M.C. et al.* A thermophilic *Bacillus* isolated from an Eolian shallow hydrothermal vent, able to produce exopolysaccharides. *Syst Appl Microbiol.* 2000; 23(3): 426–32.
49. *Hayashi K., Nakano T., Hashimoto M. et al.* Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *Int Immunopharmacol* 2008; 8 (1): 109–116.
50. *Беседнова Н.Н., Макаренкова И.Д., Звягинцева Т.Н. и др.* Ингибирующее действие полисахаридов морских гидробактерий на формирование биопленок. Антибиотики и химиотерапия. — 2016. — № 9–10. — С. 64 [in Russian] — 71. / *Besednova N.N., Makarenkova I.D., Zvyagintseva T.N. i dr.* Ingibiruyushchee dejstvie polisakharidov morskikh gidrobakterij na formirovanie bioplenok. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2016; 61: (9–10): 64–71. [in Russian]
51. *El Essawy A. K., Abu Shady H.M., Abu El Kher A.M., Helal M.M.* Molecular characterization of a marine klebsiella isolate by 16s ribosomal rna gene sequence and optimization of its exopolysaccharide production. *Egypt J Exp Biol (Bot.)* 2015; 11 (2): 227–236.
52. *El Essawy A.K., Abu Shady H.M., Abu El Kher A.M., Helal M.M.* Antimicrobial, anticoagulation, fibrinolytic and prebiotic activities of exopolysaccharide produced by marine *Klebsiella* spp. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)* 2016; 12 (2): 267–274. doi: 10.4172/1948-5948-C1-034
53. *Голуб А. В.* Бактериальные биопленки — новая цель терапии? *Клин микробиол антимикроб химиотерапия* 2012; 14: 1: 23–29. / *Golub A.V.* Bakterial'nye bioplenki — novaya tsel' terapii? *Klin mikrobiol antimikrob khimioterapiya* 2012; 14: 1: 23–29. [in Russian]
54. *Spanò A., Laganà P., Visalli G. et al.* In vitro antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14. *Curr Microbiol* 2016; 72 (5): 518–28. doi: 10.1007/s00284-015-0981-9.
55. *Маянский А.Н., Чеботарь И.В.* Стратегия управления бактериальным биопленочным процессом. *Журнал инфектологии.* — 2012. — Т. 4 — № 3. — С. 5–15. / *Mayanskij A.N., Chebotar' I.V.* Strategiya upravleniya bakterial'nym bioplenochnym protsessom. *Zhurnal infektologii* 2012; 4: 3: 5–15. [in Russian]

56. Donlan R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8: 9: 881—890.
57. Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 2009; 14 (7): 2535—2554. doi: 10.3390/molecules14072535.
58. Jiang P., Li J., Han F. et al. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One* 2011; 6 (4): 18514. doi: 10.1371/journal.pone.0018514
59. Brian-Jaisson F., Molmeret M., Fahs A. et al. Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances produced by the marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* strain TC14. *Biofouling* 2016; 32 (5): 547—60. doi: 10.1080/08927014.2016.1164845.
60. Papa R., Selan L., Parrilli E. et al. Anti-Biofilm activities from marine cold adapted bacteria against *Staphylococci* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2015; 6: 1333. doi: 10.3389/fmicb.2015.01333
61. Wittschier N., Lengsfeld C., Vorhies S. et al. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *Pharm Pharmacol* 2007; 59 (6): 777—786. doi: 10.1211/jpp.59.6.0004
62. Kim H.S., Kim S.M., Lee H.J. et al. Expression of the cpdA gene, encoding a 3',5'-cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase, is positively regulated by the cAMP-cAMP receptor protein complex. *Bacteriol* 2009; 191 (3): 922—930. doi: 10.1128/JB.01350-08
63. Valle J., Da Re S., Henry N. et al. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (33): 12558—12563.
64. Sayem S.M., Manzo E., Ciavatta L. et al. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories* 2011; 10: 74. doi: 10.1186/1475-2859-10-74
65. Erejuwa O. Effect of honey in diabetes mellitus: matters arising. *J Diabetes Metab Disord* 2014; 13 (1): 23. doi: 10.1186/2251-6581-13-23
66. Крыжановский С. П., Гельцер Б.И., Запорожец Т.С. и др. Бурые водоросли Тихого океана в лечении и профилактике атеросклероза. Владивосток. Дальнаука. — 2016. — 152 с. / Kryzhanovskij S. P., Gel'ser B. I., Zaporozhets T. S. i dr. Burye vodorosli Tikhogo okeana v lechenii i profilaktike ateroskleroza. Vladivostok. Dal'nauka 2016; 152 s. [in Russian]
67. Zhou X., Wang F., Yang H. et al. Selenium enriched exopolysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206 alleviate adipose inflammation in diabetic KKAY mice through the AMPK/Sirt1 pathway. *Mol Med Rep* 2014; 9 (2): 683—688. doi: 10.3892/mmr.2013.1859
68. Ghoneim M.A.M., Hassan A.I., Mahmoud M.G. et al. Effect of polysaccharide from *Bacillus subtilis* sp. on cardiovascular diseases and atherogenic indices in diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16: 112. doi: 10.1186/s12906-016-1093-1.
69. Rollet-Labelle E., Grange M.J., Elbim C. et al. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Radic Biol Med* 1998; 24 (4): 563—572.
70. Вельков В.В. Новые международные критерии инфаркта миокарда и высокочувствительные тропонины: новые возможности и новые проблемы. Клиническая лабор диагностика. — 2014. — № 2. — С. 64: 59—71. / Vel'kov V. V. Novye mezhdunarodnye kriterii infarkta miokarda i vysokochuvstvitel'nye troponiny: novye vozmozhnosti i novye problemy. Klinicheskaya labor diagnostika 2014; 2: 64: 59-71. [in Russian]
71. Postic C., Dentin R., Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 2004; 30 (5): 398—408.
72. Senni K., Singuin C., Collec-Jouaults et al. Sulfated depolymerized derivatives of exopolysaccharides (EPS) from mesophilic marine bacteria, method for preparing same, and uses thereof in tissue regeneration. 0.131,472. US Patent 2008; jun 5.
73. Rederstorff E., Rethore G., Weiss P. et al. Enriching a cellulose hydrogel with a biologically active marine exopolysaccharide for cell-based cartilage engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11 (4): 1152—1164. doi: 10.1002/term.2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Беседнова Наталья Николаевна — академик РАН, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

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

Андрюков Борис Георгиевич — д. м. н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., зав. лаб. иммунологии ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Михайлов Валерий Викторович — чл.-корр. РАН, профессор, руководитель Коллекции морских микроорганизмов ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова» ДВО РАН, Владивосток

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

Белок микротрубочек β_{III} -тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках

И. А. МАМИЧЕВ¹, Т. А. БОГУШ¹, Е. А. БОГУШ¹, Н. С. ТЕРЕНТЬЕВА², В. Ю. КИРСАНОВ³, М. М. ДАВЫДОВ¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина МЗ РФ, Москва

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

³ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

Microtubule Protein β_{III} -Tubulin: Structure, Expression and Functions in Normal and Tumor Cells

I. A. MAMICHEV¹, T. A. BOGUSH¹, E. A. BOGUSH¹, N. S. TERENTYEVA², V. YU. KIRSANOV³, M. M. DAVYDOV¹

¹ N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

В обзоре литературы представлены данные о белке микротрубочек β_{III} -тубулине (TUBB3): его структуре, функциях, роли в опухолевой прогрессии, экспрессии в нормальных клетках, а также в опухолях нервной системы и в эпителиальных опухолях разных локализаций. Рассмотрены основные принципы работы системы микротрубочек и связь TUBB3 с родственными белками семейства β -тубулинов. Проанализированы перспективы использования TUBB3 в клинической практике как прогностического маркера агрессивности течения заболевания и резистентности опухоли к лекарственной терапии. Сформулировано новое представление о молекулярной диагностике локальной распространённости опухолевого процесса на основании сравнительной оценки уровня экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани каждого больного. В заключение обоснована необходимость изучения экспрессии TUBB3 и других опухолевых маркеров не только в самой опухоли, но и в нормальной ткани органа, визуально не вовлечённой в опухолевый процесс.

Ключевые слова: β -тубулин, TUBB3, микротрубочки, цитоскелет, опухолевая трансформация, метастазирование, лекарственная устойчивость, прогностические маркеры, молекулярная диагностика злокачественных новообразований.

The present review contains data on microtubular protein β_{III} -tubulin (TUBB3): its structure, functions, role in tumor progression, expression in normal cells and in neural and epithelial tumors of different origins. Basic working principles of microtubular system and links between TUBB3 and related β -tubulins are also briefly reviewed. We analyzed the clinical potential of TUBB3 as prognostic marker of tumor aggressiveness and drug-resistance and suggested that locally disseminated tumor cells might be found by comparison of TUBB3 expression in normal and tumor tissue of each patient. Finally, we conclude that screening for TUBB3 and other tumor markers in morphologically normal tissue adjacent to the tumor is essential for accurate diagnostics.

Keywords: β -tubulin, TUBB3, microtubules, cytoskeleton, neoplastic transformation, metastasis, drug-resistance, prognostic markers, molecular diagnosis of malignant tumors.

Введение

Бета-тубулины — семейство белков, входящих в состав микротрубочек, у позвоночных известно как минимум 9 изоформ бета-тубулина, которые кодируются разными генами, расположенными на разных хромосомах, и имеют тканеспецифичные паттерны экспрессии.

Функциональное значение наблюдаемого разнообразия бета-тубулинов ещё предстоит определить, однако вероятно, что в том числе благодаря ему в одном организме поддерживается многообразие клеточных типов по форме, подвижности и скорости пролиферации. Более того, в раз-

ных участках одной клетки зачастую представлены разные модификации и изоформы тубулина, соотношение которых может меняться в зависимости от фазы клеточного цикла. Нарушение работы этой сложной системы может привести к широкому спектру патологических изменений клеточной локомоции, пролиферации, секреции, формы и размера клеток.

Многие опухоли характеризуются изменённым профилем экспрессии тубулинов. Не исключено, что экспрессия определённых изоформ этого белка даёт опухолевой клетке селективные преимущества, стимулирует потерю связи с микроокружением, инвазию, метастазирование, устойчивость к гипоксии и цитотоксическим воздействиям.

На сегодняшний день из всей группы наиболее полно изучен β_{III} -тубулин (TUBB3), причём

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 115478 Москва, Каширское шоссе, 23. НМИЦ им. Н. Н. Блохина

именно в клинически-прикладном контексте, поскольку этот белок регистрируется в широком спектре опухолей разных локализаций и традиционно считается фактором, отвечающим за развитие резистентности опухолей к препаратам из группы таксанов.

За последние годы появились данные, свидетельствующие о том, что TUBB3 в опухолевой клетке не только определяет её устойчивость к таксанам, но также обеспечивает выживание в неблагоприятном микроокружении и увеличивает метастатический потенциал.

Основные принципы работы микротрубочек

Микротрубочки — линейные белковые полимеры диаметром около 24 нм, которые образуют в клетках трёхмерные упорядоченные структуры, а также входят в состав центриолей, аксонов и базальных телец. Работа системы микротрубочек лежит в основе подвижности эукариотической клетки, транспорта органоидов, поддержания клеточной архитектуры, а также расхождения хромосом в митозе и мейозе. Обеспечение этих функций достигается благодаря способности микротрубочек к самосборке из субъединиц белков α и β -тубулина, которые присутствуют в цитоплазме в свободной форме [1]. Переход тубулина от растворённой к связанной форме происходит, когда его концентрация достигает некоторого порогового значения при условии наличия в среде ГТФ и Mg^{2+} [2].

В образовании микротрубочки выделяют три фазы. Фаза нуклеации или замедленная фаза включает образование гетеродимеров α и β -тубулина и начало их ассоциации друг с другом. Для того чтобы тубулиновый гетеродимер ассоциировал с другим гетеродимером, формируя протофиламент, ГТФ должен быть связан как с α , так и с β -субъединицами. Димеры ассоциируют упорядоченно, по принципу «голова-хвост»; на минус-конце находится молекула α -тубулина, на плюс-конце — молекула β -тубулина. Тело микротрубочки состоит из 13 протофиламентов, формирующих листок, свернутый в цилиндр. После образования листка структура становится более стабильной и наступает фаза элонгации — быстрый рост микротрубочки благодаря добавлению новых димеров, которые связываются с её плюс-концом. С наступлением фазы равновесия длина полимера в растворе не меняется [3]. В клетке большинство микротрубочек не собираются *de novo*, а радиально отходят от центров организации микротрубочек (ЦОМТ), которые играют роль «затравки», позволяющей пропустить фазу нуклеации.

Изоформы β -тубулина

Суперсемейство тубулинов включает в себя несколько семейств: α , β , γ , δ , ϵ , ζ и η -тубулины

[4]. В состав микротрубочек входят только α и β -тубулины, остальные белки выполняют регуляторную функцию. Семейства α и β являются мультигенными: на 2017 год у позвоночных известно 9 изоформ α -тубулина и 9 изоформ β -тубулина, которые кодируются разными генами, расположенными на разных хромосомах [5]. Мультигенные свойства α -тубулина пока мало изучены, гораздо больше известно об изоформах β -тубулина.

В организме человека и других млекопитающих экспрессия изоформ β -тубулина тканеспецифична. Ткани, в которых экспрессированы определённые изотипы β -тубулина, подробно рассмотрены в обзоре Ричарда Лудуэни (Richard Ludueña) [6]. На момент написания обзора таких изотипов было известно 7. β_1 -тубулин присутствует во всех тканях и, наряду с β_v -тубулином, составляет минорный компонент базальных тел жгутиков и ресничек. β_{II} -тубулин более характерен для эмбриональных тканей, иногда неспецифически экспрессируется в опухолях. TUBB3 представлен в нейронах, меланоцитах и часто экспрессируется в опухолях. В экспериментальной эмбриологии данный белок используется как маркер нейрональной дифференцировки. У млекопитающих β_{IV} -тубулин представлен двумя формами — β_{IVa} и β_{IVb} , причём β_{IVa} -тубулин экспрессируется исключительно в нервной ткани (как в нейронах, так и в глиальных клетках; есть данные о его присутствии в олигодендроцитах), в то время как β_{IVb} -тубулин встречается по всему организму, особенно в семенниках, сердце и скелетной мускулатуре. β_v -тубулин присутствует практически во всех тканях, исключая головной мозг, тимус, костный мозг и лейкоциты, но при этом его содержание в клетке никогда не превышает 12–13% от всего β -тубулина. β_{VI} -тубулин встречается в лейкоцитах, тромбоцитах, мегакариоцитах, костном мозге и селезёнке.

Гены β -тубулинов являются по отношению друг к другу паралогами — гомологами, возникшими в результате нескольких последовательных дупликаций одного исходного гена. По-видимому, наиболее древней, предковой формой был β_{IV} -тубулин — обязательный компонент ресничек и жгутиков как простейших, так и многоклеточных животных [6]. В соответствии с гипотезой неофункционализации, дупликация гена высвобождает одну из копий от необходимости выполнять функции предковой формы и, таким образом, появляется потенциал для развития новой функции [7]. Вопрос о том, случайно ли наблюдаемое распределение и существуют ли специфические функции у разных изоформ β -тубулина в настоящее время активно изучается. Наиболее полно исследованы свойства TUBB3, который часто экспрессируется в опухолях и считается маркером устойчивости к таксанам. Особенности этого белка

делают его хорошим кандидатом на роль прогностического маркера, позволяющего охарактеризовать агрессивность течения таких заболеваний, как немелкоклеточный рак лёгкого, рак молочной железы, рак яичников и рак желудка [8].

Специфические особенности TUBB3

В 1994 г. было показано, что микротрубочки меняют свои динамические характеристики в зависимости от изоформ β -тубулина, входящих в их состав. *In vitro* нуклеация микротрубочек, состоящих исключительно из $\alpha\beta_{III}$ -димеров, занимает больше времени, однако получившиеся структуры более динамичны: сборка и разборка плюс концов $\alpha\beta_{III}$ -микротрубочек происходит вдвое быстрее по сравнению с микротрубочками, состоящими из $\alpha\beta_{II}$ и $\alpha\beta_{IV}$ димеров [9].

Пока не известно, зависит ли подвижность клетки от динамических характеристик микротрубочек. Если допустить, что клетки с $\alpha\beta_{III}$ -микротрубочками более подвижны, сразу несколько эмпирических фактов находят объяснение. Во-первых, у млекопитающих TUBB3 присутствует в эмбриональных тканях, которые быстро растут, мигрируют и меняют форму. В постнатальном периоде экспрессия TUBB3 снижается [10, 11]. Во-вторых, объясняется гиперэкспрессия TUBB3 в клетках инвазивного фронта колоректальной карциномы [12]. Ещё одна недавно открытая особенность TUBB3 связана с клеточной пролиферацией. В некоторых опухолевых клеточных линиях, а также в эмбриональных фибробластах и кератиноцитах, присутствие TUBB3 регистрируется в области веретена деления [13]. Возможно, высокая скорость сборки–разборки $\alpha\beta_{III}$ -микротрубочек оказалась полезной для митоза. Эта гипотеза нуждается в дальнейшей проверке, однако представляется вероятным, что гиперэкспрессия TUBB3 в опухолях может значительно ускорить их пролиферацию. И это может объяснить наблюдаемую во многих клинических исследованиях корреляцию между высокой экспрессией TUBB3 и агрессивностью злокачественных новообразований (см. ниже).

По-видимому, TUBB3 может выполнять защитные функции в нормальных и опухолевых тканях. Несмотря на то, что белок широко представлен в нервной ткани (более 25% всего β -тубулина в нейронах), присутствия в клетках его гомолога β_{II} -тубулина достаточно для осуществления основных функций, таких как аксональный транспорт и регенерация повреждённых отростков [14]. На первый взгляд, экспрессия TUBB3 в нейронах необязательна, а учитывая данные об усиленной динамике микротрубочек, включающих $\alpha\beta_{III}$ -димеры, даже вредна: микротрубочки нервной системы относительно стабильны, и нейроны экспрессируют большое количество

белков MAP, по-видимому, лишь для того, чтобы ингибировать их избыточную активность [15].

Очевидно, белок обладает некими уникальными свойствами, которые необходимы для нормальной работы нейронов. В обзоре, посвящённом эволюции тубулинов, Р. Лудуэнья объясняет присутствие TUBB3 в нейронах его устойчивостью к окислительному стрессу. У наиболее распространённых в организме человека β -тубулинов: β_I , β_{II} , и β_{IV} , в 239 положении аминокислотной последовательности присутствует цистеин, который легко окисляется, формируя дисульфидные мостики между молекулами α и β -тубулина, тем самым ингибируя сборку микротрубочек. Иными словами, микротрубочки являются редокс-зависимыми структурами. В TUBB3 239 цистеин замещен на серин, что делает молекулу устойчивой к окислению. Это особенно интересно, учитывая, что в тканях, для которых в норме характерен высокий уровень TUBB3, регистрируется повышенный уровень нитроксильных радикалов и супероксида [6].

Многие макромолекулы, способные связываться с молекулой TUBB3, участвуют в реализации ответа на оксидативный стресс и кислородно-глюкозную депривацию. Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что появление TUBB3 на эволюционном древе приблизительно совпадает с кислородным скачком в конце протерозоя около 500 млн лет до н. э. Особая роль TUBB3 в эволюции цитоскелета, согласно Р. Лудуэнья, заключается в том, что этот белок возник как адаптация к резко возросшему уровню кислорода в атмосфере, но, в силу своих канцерогенных свойств, сохранился лишь в некоторых тканях, где польза от его экспрессии перевешивает возможный вред [6].

Если TUBB3 защищает клетки от повреждений, вызванных оксидативным стрессом, можно ожидать, что нарушение его синтеза приведёт к повышению чувствительности клеток к такому стрессу. Действительно, в культивируемых клетках нейробластомы нокдаун TUBB3 в нормальных условиях никак не влияет на жизнеспособность, но стимуляция окислительного стресса комбинацией глутамата и глицина приводит к гибели или повреждению до 50% клеток [14]. Нокдаун TUBB3 в линиях H460 и Calu-6 (немелкоклеточный рак лёгкого) повышает их чувствительность к противоопухолевым агентам, в частности, к доксорубину [16]. Неспецифическая цитотоксичность доксорубина как раз связана с увеличением продукции активных форм кислорода, что приводит к уменьшению внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала и, в конечном итоге, к индукции апоптоза [17]. Устойчивость TUBB3 к окислению — это одна из возможных причин резистентности опухо-

лей с высокой экспрессией белка к противоопухолевой терапии (см. ниже).

Благодаря устойчивости к окислению TUBB3 наиболее успешно справляется с неканонической функцией β -тубулинов — регуляцией энергетического обмена клетки. Известно, что свободный тубулин способен ассоциировать с разнообразными биологическими мембранами, в частности с наружными мембранами митохондрий [18]. Появившиеся в последнее время работы свидетельствуют о том, что свободные $\alpha\beta$ -димеры способны блокировать потенциал-зависимые анионные каналы митохондрий, замедляя обмен метаболитами, такими как АТФ, фосфат и сукцинат между митохондриями и цитозолем [19]. Учитывая, что митохондрии являются источниками супероксидных анионов, устойчивый к окислению TUBB3 как регулятор клеточного дыхания имеет преимущество перед другими изоформами. Анализ распределения β -тубулинов в 7 клеточных линиях человека подтверждает эту гипотезу: среди свободных β -тубулинов, секвестрированных на наружной мембране митохондрий преобладает именно TUBB3 [20]. Ингибирование работы митохондрий и переход на аэробный гликолиз — важный этап опухолевой трансформации, и TUBB3, по-видимому, может способствовать этому процессу.

Ещё одна функция TUBB3, важная с точки зрения развития опухолевого процесса, заключается в ингибировании апоптоза. В нормальном эпителиальном пласте постоянно активен сигнал к выживанию, идущий от внеклеточного матрикса через интегрины по сигнальной сети, включающей, в частности, сигнальную ось PTEN/Akt. Активированный Akt ингибирует посредством фосфорилирования ряд проапоптотических белков (в частности Bad), подавляет экспрессию проапоптотических генов и поддерживает митохондриальный гомеостаз, тем самым способствуя выживанию клеток. Потеря контакта интегринов с белками внеклеточного матрикса приводит к разрыву Akt-сигнального пути и индукции апоптоза. Для эпителиальной опухолевой клетки апоптоз (гибель клетки, вызванная откреплением от внеклеточного матрикса) служит основным барьером на пути к метастазированию, и приобретение устойчивости к нему — один из ключевых этапов в процессе малигнизации. Недавнее исследование продемонстрировало роль TUBB3 в возникновении устойчивости к апоптозу [21]. Опыты на клеточной культуре H460 (немелкоклеточный рак лёгкого), показали, что нокдаун TUBB3 приводит к следующим изменениям:

1) округлые клетки с плохо различимыми актиновыми стресс-фибриллами (фенотип, характерный для суспензионных культур и клеток асцитных опухолей) приобретают распластанную форму и восстанавливаются стресс-фибриллы;

2) после нокдауна восстанавливается чувствительность клеток к апоптозу;

3) повышается сродство клеток к фибронектину — основному белку межклеточного матрикса;

4) изменяется молекулярный профиль: уровень фосфорилированного (активного) Akt снижается, а уровень экспрессии PTEN (фосфатазы, инактивирующей Akt) повышается.

Итак, TUBB3 поддерживает антиапоптотический сигнал даже в случае потери связи между интегринными и внеклеточным матриксом.

Приведённая работа — ещё один пример возможного вклада TUBB3 в опухолевую прогрессию.

И, наконец, в литературе накопились сведения, что $\alpha\beta$ -микротрубочки устойчивы к воздействию таксанов. β -тубулин является мишенью многих противоопухолевых препаратов, нацеленных на остановку клеточного цикла и последующую гибель неопластических клеток. Среди таких препаратов можно выделить агенты, стабилизирующие микротрубочки (таксанов), и дестабилизирующие (алкалоиды Винка). Связываясь с β -тубулином, антитубулиновые агенты задерживают или блокируют переход из метафазы в анафазу митоза за счёт нарушения образования веретена деления [22].

Пристальный интерес к TUBB3 со стороны клиницистов обусловлен, прежде всего, классической концепцией, согласно которой экспрессия данного белка является причиной устойчивости опухолей к таксанам [23].

Механизм взаимодействия паклитаксела с микротрубочками детально рассмотрен в работе Холли Фридман (Holly Freedman) и коллег [24]. Было локализовано точное место проникновения паклитаксела внутрь растущей микротрубочки, идентифицированы сайты связывания — промежуточный и конечный, подсчитана кинетика и энергетика реакции. Также было показано, что проникновение молекулы паклитаксела внутрь микротрубочки происходит в несколько этапов, один из которых включает формирование водородной связи с 275 серином, который в молекуле TUBB3 замещен на аланин. Авторы предлагают следующее объяснение резистентности опухолей к таксанам: в резистентных опухолевых клетках микротрубочки построены в основном из $\alpha\beta$ -димеров. Замена одной аминокислоты приводит к понижению константы скорости реакции и увеличению среднего времени, необходимого для связывания молекулы паклитаксела с нескольких секунд до десятков минут. Этот временной интервал приблизительно соответствует среднему времени жизни микротрубочек. Таким образом, лишь небольшое число молекул лекарства успевает связаться с мишенью до того как начнется деполимеризация и тубулиновые димеры из связанной формы перейдут обратно в растворимую.

В настоящее время некоторые авторы отмечают, что в клинических исследованиях корреляция между уровнем TUBB3 и эффективностью терапии таксанами прослеживается далеко не всегда. Более того, существуют данные о высокочувствительных опухолях, активно экспрессирующих TUBB3. В некоторых клеточных линиях человека TUBB3 связан с резистентностью не только к таксанам, но и к другим цитостатикам, в частности, к цисплатину [16].

Дизайн новых специфических ингибиторов TUBB3 — весьма сложная задача, ввиду отсутствия адекватной модели *in vitro*, отражающей сборку микротрубочек с учётом белков-регуляторов и посттрансляционных модификаций тубулина. Более продуктивным может оказаться подход «сверху», нацеленный на ингибирование клеточных онкогенов, таких как GBR-1 и PIM-1, которые регулируют экспрессию не только TUBB3, но и ряда других белков, вовлечённых в прогрессию опухоли [25].

Итак, представление о том, что экспрессия TUBB3 является необходимым и достаточным условием для возникновения устойчивости к таксанам — упрощение. С учётом новых данных о полифункциональности TUBB3, сложности его регуляции и большого количества взаимодействующих белков, становится очевидным, что анализа единственного маркера недостаточно для адекватного прогноза резистентности [23]. Более того, помимо TUBB3 в инактивации таксанов участвует ещё как минимум один белок — ABC-транспортёр Pgp, который селективно выбрасывает препараты этой группы из клетки. Реальный вклад TUBB3 в развитие резистентности к таксанам сложно оценить ещё и потому, что эти препараты практически никогда не применяются в монотерапии. Обычно их применяют в комбинации с другими цитостатиками, резистентность к которым развивается по другим механизмам.

Регуляция экспрессии TUBB3

Как показывают исследования на клеточных культурах рака яичников, экспрессия TUBB3 может быть реализована в ответ на гипоксию, гипогликемию или повышение уровня активных форм кислорода. Роль цитоскелета в адаптации опухолевой клетки к агрессивному микроокружению — перспективная, но ещё малоизученная тема. В условиях гипоксии роль TUBB3 состоит в инкорпорации антиапоптотических киназ, таких как PIM1, в состав цитоскелета. Экспрессия TUBB3 в ответ на гипоксию закодирована в самой структуре гена *TUBB3* — его 3'-фланкирующая область содержит последовательность, которая связывается с индуцируемыми при гипоксии транскрипционными факторами HIF-1 α и HIF-2 α [26]. В условиях гипогликемии и гипоксии регуляция экспрессии TUBB3 осуществляется так же и на посттранскрипционном уровне с участием РНК-связывающего белка HuR, облегчающего трансляцию TUBB3, и микроРНК miR-200C, в то время как трансляция β_1 -тубулина, наоборот, ингибируется [27].

Приобретение миграционного фенотипа — ещё одна стратегия, позволяющая опухолевой клетке выжить в неблагоприятных условиях. В некоторых клеточных линиях рака яичников экспрессия TUBB3 находится под контролем Gli1 — одного из факторов эпителиально-мезенхимального перехода. Этот факт хорошо согласуется с гипотезой о том, что $\alpha\beta$ -микроотрубочки повышают клеточную подвижность и метастатический потенциал опухолевой клетки [28].

Значительную роль в экспрессии и регуляции TUBB3 могут играть эстрогены, что было доказано на культуре клеток рака молочной железы. Показано, что воздействие эстрадиола на клетки MCF-7, экспрессирующие эстрогеновые рецепторы (ЭР) альфа, приводило к повышению уровня TUBB3 (измерялся как уровень мРНК, так и собственно белка). Такого эффекта не отмечено в экспериментах на клетках линии MDA-MD-231 с негативным статусом эстрогеновых рецепторов. В дальнейшем авторы работы показали, что антиэстрогены тамоксифен и фульвестрант ингибируют синтез TUBB3 только в ЭР-положительных клеточных культурах рака молочной железы. Анализ промотора гена *TUBB3* показал, что транскрипция гена активируется не напрямую через эстрогеновые рецепторы, так как в гене отсутствуют эстроген-респонсивные элементы (ЭРЭ), а через эстроген-зависимые транскрипционные факторы: AP-1, NF- κ B и Sp-1 [29].

В клетках Сертоли мышей и крыс ген *TUBB3*, единственный из всех генов, кодирующих β -тубулины, регулируется андрогенами. Впоследствии обнаружилось, что первый интрон гена *TUBB3* несёт 4 андроген-респонсивных элемента (АРЭ), мутация одного из которых резко снижает транскрипцию гена в ответ на стимуляцию андрогенами. Итак, экспрессия TUBB3 напрямую регулируется андрогенами, которые стимулируют сперматогенез, в том числе за счёт изменения цитоскелета клеток Сертоли [30]. Андрогенная регуляция TUBB3 также описана в нормальных нейронах и некоторых опухолях человека. К числу таких опухолей относятся, например, колоректальный рак и рак предстательной железы [31, 32].

В исследовании M. Shibasaki и коллег показано, что экспрессия TUBB3 в культивируемых клетках HEK293 (эмбриональная почка человека) и HeLa меняется в зависимости от стадии клеточного цикла. Уровень белка и мРНК в цитоплазме достигает своего пика в G2/M фазу, а затем снижается. Как оказалось, белок удаляется из цитоплазмы в G1 фазу.

В исследовании M. Shibasaki и коллег показано, что экспрессия TUBB3 в культивируемых клетках HEK293 (эмбриональная почка человека) и HeLa меняется в зависимости от стадии клеточного цикла. Уровень белка и мРНК в цитоплазме достигает своего пика в G2/M фазу, а затем снижается. Как оказалось, белок удаляется из цитоплазмы в G1 фазу.

плазмы путём убиквитин-зависимого протеолиза. Одновременно происходит репрессия транскрипции с участием транскрипционного фактора REST. Авторы считают, что TUBB3 может участвовать в пролиферации нормальных тканей, не связанных с половой и нервной системами, но в этом случае его экспрессия контролируется REST системой, а по завершении митоза, белок удаляется из цитоплазмы [33].

TUBB3 в нормальных клетках

Ген *TUBB3* человека локализован в длинном плече 16 хромосомы (16q24.3 по номенклатуре ISCN), состоит из 4 экзонов и кодирует белок длиной в 450 аминокислот [34]. В гетерозиготном состоянии мутации гена приводят к нарушениям работы глазодвигательного нерва, параличу лицевого нерва, и сенсомоторной аксональной полиневропатии [35]. Это указывает на важную роль TUBB3 в нормальном развитии нервной системы. Подобно остальным изотипам β -тубулина, TUBB3 содержит ГТФазный домен, необходимый для нормальной сборки и разборки микротрубочек. TUBB3 отличается от остальных изотипов главным образом аминокислотной последовательностью С-концевого участка, на котором локализованы сайты связывания с регуляторными белками, а также сайт-мишень паклитаксела [34].

В обзорах С. D. Katsetos и соавт. обобщены данные об экспрессии TUBB3 в нормальных тканях и опухолях центральной нервной системы [8, 36].

По ходу эмбрионального развития млекопитающих, включая человека, экспрессия TUBB3 регистрируется в следующих структурах нервной системы: нейробластах, которые впоследствии формируют кору мозжечка, сетчатку и субвентрикулярную зону; прогениторных клетках глии и дифференцированных постмитотических нейронах; клетках-предшественниках симпатoadrenalовой системы и, возможно, в клетках-предшественниках олигодендроцитов. Так же имеются данные об эмбриональной экспрессии TUBB3 в единичных клетках диффузной эндокринной системы лёгкого.

У некоторых млекопитающих экспрессия TUBB3 регистрируется во взрослом возрасте в отдельных компонентах репродуктивной системы. Так, в семенниках грызунов TUBB3 локализован в клетках Сертоли [37], а у хряка TUBB3 присутствует в жгутиках сперматозоидов [38].

Во взрослом организме человека экспрессия TUBB3 сохраняется в нейронах (как в перинуклеарном пространстве, так и в отростках) центральной и периферической нервной системы. Описано присутствие TUBB3 в меланоцитах — клетках, происходящих из нервного гребня и экспрессирующих ряд нейроспецифических маркеров [39].

Также TUBB3 обнаружен в стволовых клетках bulge-зоны волосяного фолликула [40].

TUBB3 в опухолях нервной системы

Экспрессия TUBB3 сохраняется в опухолях нервной системы, как высоко-, так и низкодифференцированных, однако его распределение в тканях неравномерно. Высокий уровень белка отмечается в клеточных популяциях, демонстрирующих нейрональную дифференцировку и ограниченный пролиферативный потенциал, в то время как в менее дифференцированных участках той же опухоли экспрессия белка значительно ниже [41, 42]. Эта закономерность наблюдается в медуллобластомах, ретинобластомах и феохромоцитомах. Поскольку экспрессия TUBB3 в опухолях данной локализации отражает степень их дифференцировки, а высокодифференцированные опухоли обычно медленнее растут и реже метастазируют, можно сделать вывод, что те опухоли, в которых уровень TUBB3 остается высоким, в целом должны иметь лучший прогноз. Тем не менее, для медуллобластом высокая степень дифференцировки ассоциирована с худшим прогнозом общей выживаемости [43]. С. D. Katsetos и соавт. подчеркивают, что, учитывая сложность и противоречивость биологического контекста, нельзя однозначно установить связь между экспрессией TUBB3 и прогнозом заболевания. По-видимому, анализ экспрессии TUBB3 в этих опухолях не имеет перспектив для клинического использования [8].

В глиомах, напротив, присутствие TUBB3 ассоциировано с низкой степенью дифференцировки, поскольку в нормальных клетках глии этот белок не экспрессируется. Результаты иммуногистохимического исследования тканевых матриц 378 опухолей мозга с использованием 37 моноклональных антител демонстрируют, что TUBB3 входит в число 6 маркеров, отражающих разницу между высоко- и низкодифференцированными глиомами [44]. Для астроцитарных и олигодендроцитарных опухолей также показана прямая корреляция между высоким уровнем экспрессии TUBB3 и пролиферативным индексом Ki-67 [45, 41]. Более того, уровень экспрессии TUBB3 в астроцитомах оказался выше на поздних стадиях заболевания, чем на ранних [45]. По-видимому, наблюдаемые TUBB3-позитивные структуры в глиомах представляют собой наиболее агрессивные и низкодифференцированные субклоны опухолевых клеток, обладающие наибольшим туморогенным потенциалом. Интересно отметить, что в тканевых образцах мультиформной глиобластомы выделяются две фракции TUBB3-позитивных клеток: (а) низкодифференцированные небольшие анапластические клетки, напоминающие глиальные клетки-предшественники или бипо-

тентные клетки кортикальных предшественников и (б) опухолевые клетки, находящиеся на границе ишемического некроза [46]. Последнее согласуется с экспериментальными данными, согласно которым экспрессия TUBB3 в условиях *in vitro* может включаться в ответ на гипоксию (см. выше).

TUBB3 в эпителиальных опухолях человека

Экспрессия TUBB3 часто регистрируется и в опухолях эпителиального происхождения, при том, что в норме в эпителии этот белок не экспрессируется [47]. Рак яичников — первая опухоль, для которой показана ассоциация TUBB3 с устойчивостью к таксанам [48, 49]. В дальнейшем было неоднократно подтверждено, что экспрессия TUBB3 также ассоциирована с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости пациентов, получавших лекарственную терапию на основе препаратов платины и таксанов [50, 51].

Ещё в одном исследовании было продемонстрировано, что среди всех гистологических типов рака яичников высокий уровень TUBB3 чаще обнаруживается в светлоклеточной аденокарциноме, которая признана наиболее устойчивой к химиотерапии [52].

Для этой же гистологической формы был получен парадоксальный результат: вопреки ожиданиям, гиперэкспрессия TUBB3 ассоциировалась с лучшим прогнозом общей выживаемости среди пациентов, получавших химиотерапию [53].

В ткани немелкоклеточного рака лёгкого также обнаружена экспрессия TUBB3. Данные исследований прогностической и предиктивной роли TUBB3 объединены в обзорах Яна Якобсона (J. N. Jakobsen) 2014 и 2015 гг. [54, 55]. Кратко: (1) высокий уровень экспрессии в опухоли TUBB3 ассоциирован с уменьшением эффективности химиотерапии и продолжительности жизни больных по сравнению с группой пациентов с низкой экспрессией маркера в опухоли; (2) результаты большинства исследований показывают, что экспрессия в опухоли TUBB3 достоверно выше на поздних стадиях немелкоклеточного рака лёгкого и выше в ткани аденокарциномы по сравнению с плоскоклеточным раком лёгкого; (3) в зависимости от стадии заболевания разные исследования дают разные результаты относительно клинической значимости TUBB3 как маркера устойчивости к таксанам и прогноза заболевания.

Экспрессия TUBB3 широко исследована в опухолях молочной железы. В частности, иммуногистохимический анализ 1652 хирургических биопсийных образцов опухолей выявил корреляцию между уровнем TUBB3 и степенью злокачественности, индексом пролиферации Ki-67, амплификацией HER2 и другими прогностически неблагоприятными признаками [56]. В то же вре-

мя не было выявлено связи со стадией заболевания и метастазированием, что, по словам авторов статьи, ставит под сомнение ключевую роль белка в опухолевой прогрессии и метастазировании. Большинство исследований свидетельствуют об отсутствии выраженной связи между уровнем TUBB3 и такими показателями, как общая и безрецидивная выживаемость пациентов и устойчивость к химиотерапии на основе таксанов [23]. По мнению авторов, это может быть связано с тем, что экспрессия TUBB3 в клетках рака молочной железы регулируется эстрогеновыми рецепторами, а опухоли с экспрессией эстрогеновых рецепторов более чувствительны к гормональной и цитотоксической терапии. С точки зрения прогноза эффективности лечения позитивный статус эстрогеновых рецепторов может «перевешивать» неблагоприятные эффекты TUBB3.

Важные данные получены в ходе исследования метастазов рака молочной железы в головной мозг. Как оказалось, опухолевые клетки, локализованные в мозге, экспрессируют нейроспецифические маркеры: TUBB3, Нестин и AchE. Продолжив исследование на модельных клеточных культурах, авторы показали, что нокдаун гена TUBB3 снижает миграционную активность клеток, что еще раз подтвердило участие белка в процессах инвазии и метастазирования [57].

TUBB3 также обнаружен в ткани рака желудка. По разным оценкам доля опухолей, экспрессирующих TUBB3, составляет от 37% [58] до 67% [59]. Поскольку ключевой группой препаратов, применяемых в лекарственной терапии распространённого рака желудка, являются таксаны, неоднократно предпринимались попытки понять, существует ли связь между высокой экспрессией TUBB3 и эффективностью химиотерапии. В совокупности проведённые исследования не дают чёткого ответа на этот вопрос [23].

Статус TUBB3 в ткани колоректального рака изучен в ряде работ. Разные исследования дают разные оценки доли TUBB3-позитивных опухолей: от 23 [60] до 82% [61]. Для опухолей данной локализации продемонстрирована связь между высоким уровнем TUBB3 и андрогеновыми рецепторами [31]. Продолжив работу на клеточных культурах, авторы убедились, что экспрессия белка запускается в ответ на стимуляцию андрогенами (см. выше).

В исследовании Анны Портянко показано, что TUBB3 в ткани колоректального рака экспрессируется неравномерно: максимальный уровень наблюдается в клетках инвазивного фронта [12]. Так же показано, что уровень TUBB3 зависит от преобладающего гистеоархитектонического строения опухоли: максимальная экспрессия наблюдается в участках, не имеющих тубулярного строения, минимальная — в простых и сложных

железах. При этом экспрессия TUBB3 практически отсутствует в морфологически нормальной слизистой оболочке желудка. Так же было показано, что гиперэкспрессия TUBB3 — лишь часть комплексного процесса ремоделирования цитоскелета в опухолях толстой кишки. Этот процесс включает повышение уровня β_1 , β_{III} и β_{III} тубулинов, тирозинированного α -тубулина и понижение уровня ацетилированного α -тубулина [62].

Экспрессия TUBB3 выявлена и в ткани рака простаты. Высокая экспрессия позволяет дифференцировать резистентный рак предстательной железы и гормончувствительный. У пациентов с резистентными опухолями уровень TUBB3 обычно возрастает на фоне гормональной терапии антиандрогенами [32]. TUBB3, по некоторым данным, также является независимым прогностически неблагоприятным фактором общей и безрецидивной выживаемости пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии [63]. Впрочем, в другом исследовании подтвердилась лишь связь TUBB3 с безрецидивной выживаемостью [64]. По-видимому, основной потенциал клинического использования TUBB3 в терапии рака предстательной железы связан с предсказанием эффективности гормональной терапии.

В ткани рака мочевого пузыря высокая экспрессия TUBB3 ассоциирована с хромосомными нарушениями и ускоренной пролиферацией опухолевых клеток [65].

Экспрессия TUBB3 в ткани рака почки сильно зависит от гистологического типа опухоли. Чаще всего TUBB3 регистрируется в папиллярных карциномах, онкоцитомах и хромоформных карциномах, реже — в светлоклеточных карциномах. При этом именно в светлоклеточных карциномах экспрессия TUBB3 ассоциируется с прогностически неблагоприятными признаками, такими как высокая степень злокачественности по Фурману, наличие метастазов в лимфоузлах и отдаленных метастазов, низкая общая выживаемость. Парадоксальным образом для папиллярных почечноклеточных карцином наблюдается обратная зависимость: высокая экспрессия TUBB3 коррелирует с ранней стадией заболевания и лучшим прогнозом по общей выживаемости [66].

Выше приведен далеко не полный перечень опухолей, экспрессирующих TUBB3. Экспрессия белка описана для многих злокачественных новообразований. К таким опухолям относятся: рак шейки матки [67], плоскоклеточный рак головы и шеи [68], рак вилочковой железы [69], меланома [70], экстрамамиллярный рак Педжета [71], базальноклеточный рак кожи [72], рак поджелудочной железы [21], мелкоклеточный рак легкого [73], мезотелиома плевры [74]. Неоднородна экспрессия TUBB3 в патологических клетках при различных лимфопролиферативных заболеваниях

ях [75]. Однако к настоящему моменту влияние этого важнейшего маркера на агрессивность течения болезни и чувствительность опухоли к химиотерапии изучено недостаточно.

Перспективы использования TUBB3 в клинической практике

Как неоднократно отмечалось выше, попытки связать экспрессию TUBB3 с прогнозом заболевания или резистентностью к химиотерапии зачастую приводят к противоречивым результатам. Дискордантность результатов клинических исследований может быть обусловлена тем, что мы по-прежнему мало знаем о регуляции гена TUBB3 и его связи с другими опухолевыми маркерами. В зависимости от типа пораженного органа, гистологической формы новообразования, стадии заболевания или схемы лекарственного лечения, TUBB3 может вносить разный вклад в опухолевую прогрессию и устойчивость к химиотерапии. К примеру, в ткани рака молочной железы с позитивным статусом эстрогеновых рецепторов, по крайней мере на культуральных моделях, экспрессия TUBB3 находится под контролем эстрогенов. Если этот механизм сохраняется в опухолях *in vivo*, то присутствие белка в биопсийном образце будет указывать на чувствительность опухоли к антиэстрогенам и лучшие показатели выживаемости на фоне гормональной терапии. Но TUBB3 может экспрессироваться в ином биологическом контексте — как ответ на гипоксию или недостаток питательных веществ. В этом случае присутствие белка в опухоли будет свидетельствовать о её агрессивности вне зависимости от назначенного лечения [23].

На первый взгляд может показаться, что TUBB3 не подходит для рутинного клинического использования в качестве прогностического или предиктивного маркера. Действительно, пока анализ экспрессии TUBB3 не включен в стандарты скрининга или клинические рекомендации ни по одной из перечисленных нозологий. Тем не менее, предиктивный потенциал TUBB3 возрастает, если использовать его в паре с другим маркером. Для немелкоклеточного рака лёгкого это ERCC1 — компонент системы эксцизионной репарации ДНК, который определяет резистентность опухоли к препаратам платины. Эффективность совместного использования ERCC1 и TUBB3 в качестве маркеров устойчивости немелкоклеточного рака легкого к комбинации цисплатин/паклитаксел неоднократно продемонстрирована во многих исследованиях [76—79].

В 2014 г. опубликованы результаты проспективного исследования, в котором оценивалась клиническая значимость трёх маркеров: ERCC1, RRM1 и TUBB3 — для персонализированного выбора оптимальной комбинации препаратов

платины, таксанов и гемцитабина. Опытная группа пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого, в опухолях которых оценивали уровень экспрессии маркеров, была разделена на 2 подгруппы: 1 — с отсутствием или низким уровнем экспрессии ERCC1 и 2 — с высокой экспрессией маркера. Больные получали химиотерапию с включением препаратов платины только в первой подгруппе. В обеих подгруппах при назначении таксанов или гемцитабина врачи ориентировались на показатели экспрессии TUBB3 и RRM1. Препараты назначали только в случае низкой экспрессии соответствующего маркера. Контрольную группу составили пациенты, которым не удалось провести молекулярное фенотипирование из-за отсутствия опухолевого материала. Этим больным проводили стандартную химиотерапию препаратами платины в комбинации с таксанами или гемцитабином, которая выбиралась эмпирически с учётом общего состояния пациента. Анализ полученных результатов продемонстрировал большую эффективность лечения в группе молекулярно обоснованного выбора схемы химиотерапии по ряду клинических показателей — по частоте объективного ответа, а также по продолжительности безрецидивного течения болезни и одногодичной выживаемости [80]. На наш взгляд, важность этого исследования определяется тем, что продемонстрирована прогностическая информативность интегрального молекулярного фенотипирования опухоли, основанного на оценке совокупности маркеров эффективности всех препаратов, включенных в схему их комбинированного применения.

Ещё один пример: больные распространённым раком молочной железы, негативные по экспрессии TUBB3, лучше отвечают на химиотерапию. При введении в анализ дополнительных маркеров, ERCC1 и антиапоптотического белка Bcl-2, точность прогноза возрастает [81].

Уникальность TUBB3 как опухолевого маркера заключается в том, что он практически не экспрессируется в большинстве нормальных тканей. Луис Леандро-Гарсия (Luis J. Leandro-García) с соавторами методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR) исследовали экспрессию различных изоформ β -тубулина на панелях кДНК из 21 типа нормальных тканей. Оказалось, что TUBB3 высоко экспрессируется лишь в ткани головного мозга, тогда как в образцах других тканей маркер не выявляется, или уровень его экспрессии минимален (не более 3% от суммарной экспрессии разных изотипов β -тубулина). При сравнительной оценке экспрессии TUBB3 в опухолевой и соответствующей нормальной ткани органа того же больного показано, что в опухолевой ткани уровень экспрессии TUBB3 значительно превышает показатель в окружающей нормальной

ткани органа. В частности, для немелкоклеточного рака лёгкого, рака яичников и молочной железы различия достигли 71, 43 и 1000 раз, соответственно. Авторы этого исследования подчёркивают важность оценки молекулярного профиля тубулинов для прогнозирования возможных побочных проявлений антитубулиновых противоопухолевых препаратов и для разработки новых лекарств сходного механизма действия [82].

На основании результатов иммуногистохимической сравнительной оценки экспрессии TUBB3 в ткани рака кожи и немалигнизированного эпидермиса предложено использовать этот маркер для дифференциальной диагностики небольших опухолевых очагов базальноклеточной карциномы [83]. Рассматривается также возможность использовать в качестве диагностического признака утрату эктопической экспрессии TUBB3 некоторыми опухолями. В частности, показано, что меланоциты, которые в норме синтезируют белок, в ходе клеточного старения или малигнизации утрачивают его. Следовательно, анализ экспрессии TUBB3 может помочь при дифференциации меланомы и доброкачественного невуса [84].

Мы считаем, что сравнительный количественный анализ экспрессии TUBB3 в ткани опухоли и нормальной окружающей ткани органа может использоваться для молекулярной диагностики локальной распространённости опухолевого процесса, или другими словами, — для оценки вовлеченности пораженного органа в опухолевую малигнизацию. Правомочность этого представления подтверждена нами при количественной иммунофлуоресцентной оценке с использованием метода проточной цитофлуориметрии экспрессии белка TUBB3 в клетках, полученных из хирургических образцов немелкоклеточного рака лёгкого и окружающей морфологически нормальной ткани органа [85]. Экспрессия маркера в нормальной ткани лёгкого, окружающей опухолевый очаг, выявлена менее чем в половине случаев. При этом отмечены значительные различия в уровне экспрессии TUBB3 как в опухолевой, так и в нормальной ткани лёгкого разных больных, однако во всех исследованных парах сравнения «опухоль—норма» при выявлении TUBB3 в обеих тканях уровень маркера в опухоли всегда был ниже показателя в опухолевом очаге. По нашему мнению, молекулярная характеристика ткани лёгкого, окружающей опухолевый очаг, особенно важна при ранних стадиях этого заболевания, когда решение об оптимальном радикализме хирургической операции бывает неоднозначным. У таких больных представляет сложность и выбор тактики послеоперационного ведения пациентов — динамическое наблюдение или химиотерапия. В этой ситуации дополнительным аргументом может оказаться молекулярная во-

влечённость ткани поражённого органа в опухолевый процесс. И в этом смысле уровень экспрессии TUBB3 в нормальной ткани, окружающей очаг немелкоклеточного рака лёгкого, является важным ориентиром.

Заключение

Микротрубочки в клетке организованы в сложную, пластичную систему, работа которой регулируется как на уровне генома, так и на цитоплазматическом уровне. Разнообразие клеток по форме, подвижности и скорости пролиферации достигается в том числе благодаря тканеспецифичной экспрессии разных изоформ β -тубулина. Безусловно, самой изученной изоформой является β_{III} -тубулин (TUBB3), который в норме высоко специфичен для нейронов, лимфоцитов и эмбриональных тканей, но может экспрессироваться и в ткани солидных опухолей.

До недавнего времени микротрубочки в онкологии рассматривались преимущественно как мишень для лекарственной терапии, а TUBB3 — как предиктивный опухолевый маркер, свидетельствующий об устойчивости опухоли к терапии таксанами. Всестороннее изучение TUBB3 именно в таком, клинически прикладном, контексте приблизило нас к пониманию роли данного белка в процессах малигнизации и ухода опухоли из-под лечебного контроля, в то время как гипотеза о TUBB3 как о первопрочине устойчивости опухоли к терапии таксанами так и не нашла однозначного клинического подтверждения.

Сама структура TUBB3 определяет свойства микротрубочек, в состав которых он встраивается, а именно их усиленную динамику и невосприимчивость к оксидативному стрессу. TUBB3 является одним из звеньев антиапоптотического сигнального пути, который запускается в от-

вет на кислородно-глюкозную депривацию и свидетельствует о приобретении клеткой более агрессивного, метастатического фенотипа, а также устойчивости к гипоксии, гипогликемии, аноксии и различным лекарственным воздействиям. В совокупности с экспрессией ABC-транспортёров и усиленной системой репарации ДНК, экспрессия TUBB3 формирует фенотип, характерный для стволовых клеток, наиболее ценных для организма и максимально неблагоприятных с точки зрения опухолевого процесса. Обнаружение этих факторов в опухоли свидетельствует о приобретении фенотипа лекарственной резистентности к препаратам, отличающимся по структуре и механизму действия. Поэтому глубокое понимание структуры и функции TUBB3, а также связанных с ним сигнальных путей, может стать серьёзной составляющей молекулярной диагностики опухолей и важным подспорьем в выборе оптимальных схем и режимов химиотерапии.

Более того, анализ данных литературы и результаты собственных исследований позволяют авторам сформулировать представление о возможности молекулярной диагностики локальной распространенности опухолевого процесса на основании сравнительной оценки уровня экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани каждого больного. Как упоминалось выше, эта информация в определённых клинических ситуациях может явиться важным дополнительным ориентиром при выборе оптимального радикализма хирургических операций и тактики послеоперационного ведения больных. Для этого нормальная ткань органа, визуально не вовлечённая в опухолевый процесс, должна, наряду с опухолью, являться объектом молекулярного фенотипирования по экспрессии TUBB3, а возможно, и по другим молекулярным маркерам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 253—265.
2. David-Pfeuty T., Erickson H.P., Pantaloni D. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 12: 5372—5376.
3. Rezaei V., Azarenko O., Jordan M.A. et al. Microtubule assembly of isotypically purified tubulin and its mixtures. *Biophys J* 2008; 95: 4: 1993—2008.
4. Ludueña R.F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 1998; 178: 207—275.
5. Gadadhar S., Bodakuntla S., Natarajan K. et al. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 2017; 130: 8: 1347—1353.
6. Ludueña R.F. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 302: 41—185.
7. Ono S. Ancient linkage groups and frozen accidents. *Nature*. 1973; 244: 5414: 259—262.
8. Katsetos C.D., Herman M.M., Mörk S.J. Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003; 55: 2: 77—96.
9. Panda D., Miller H.P., Banerjee A. et al. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1994; 91: 24: 11358—11362.
10. Jiang Y.Q., Oblinger M.M. Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development. *J Cell Sci* 1992; 103 (Pt 3): 643—651.
11. Dráberová E., Del Valle L., Gordon J. et al. Class III β -tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *Neuropathol Exp Neurol* 2008; 2008: 341—354.
12. Portyanko A., Kovalev P., Gorgun J., Chervovoy E. Beta(III)-tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion. *Virchows Arch* 2009; 454: 5: 541—548.
13. Jouhilahti E.M., Peltonen S., Peltonen J. Class III β -tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 12: 1113—1119.
14. Guo J., Walss-Bass C., Ludueña R.F. The beta isotypes of tubulin in neuronal differentiation. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67: 7: 431—441.
15. Fanara P. et al. Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 32: 23465—23472.
16. Gan P.P., Pasquier E., Kavallaris M. Class III β -tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 19: 9356—9363.
17. Davies K.J., Doroshov J.H. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 1986; 261: 7: 3060—3067.

18. Sheldon K.L., Maldonado E.N., Lemasters J.J. et al. Phosphorylation of voltage-dependent anion channel by serine/threonine kinases governs its interaction with tubulin. *PLoS One* / ed. Kahle P J 2011; 6: 10: e25539.
19. Rostovtseva, T.K., Gurnev, P.A., Chen, M.Y., Bezrukov S.M. Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel. *Biol Chem* 2012; 287: 29589–29598.
20. Cicchillitti L., Penci R., Di Michele M. et al. Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III beta-tubulin. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 7: 2070–2079.
21. McCarroll J.A., Gan P.P., Erlich R.B. et al. TUBB3/ β III-tubulin acts through the PTEN/AKT signaling axis to promote tumorigenesis and anoikis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2015; 75: 2: 415–425.
22. Jordan A., Hadfield J.A., Lawrence N.J. et al. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998; 18: 4: 259–296.
23. Karki R., Mariani M., Andreoli M. et al. β III-Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target? *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17: 4: 461–472.
24. Freedman H., Huzil J.T., Luchko T. et al. Identification and characterization of an intermediate taxol binding site within microtubule nanopores and a mechanism for tubulin isotype binding selectivity. *J Chem Inf Model* 2009; 49: 2: 424–436.
25. Andreoli M., Persico M., Kumar A. et al. Identification of the first inhibitor of the GBP1:PIM1 interaction. Implications for the development of a new class of anticancer agents against paclitaxel resistant cancer cells. *J Med Chem* 2014; 57: 19: 7916–7932.
26. Raspaglio G., Filippetti F., Prislei S. et al. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1 α binding to its 3' flanking region. *Gene* 2008; 409: 1–2: 100–108.
27. Raspaglio G., De Maria I., Filippetti F. et al. HuR regulates beta-tubulin isotype expression in ovarian cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 14: 5891–5900.
28. Mozzetti S., Martinelli E., Raspaglio G. et al. Gli family transcription factors are drivers of paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Biochem Pharmacol* 2012; 84: 11: 1409–1418.
29. Saussède-Aim J., Matera E.L., Ferlini C. et al. Beta3-tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66: 7: 378–388.
30. De Gendt K., Denolet E., Willems A. et al. Expression of Tubb3, a beta-tubulin isotype, is regulated by androgens in mouse and rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 2011; 85: 5: 934–945.
31. Mariani M., Zannoni G.F., Sioletic S. et al. Gender influences the class III and V β -tubulin ability to predict poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 10: 2964–2975.
32. Terry S., Ploussard G., Allory Y. et al. Increased expression of class III beta-tubulin in castration-resistant human prostate cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 6: 951–956.
33. Shibasaki M., Maesawa C., Akasaka K. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of β III-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells *Oncol* 2012; 40: 3: 695–702.
34. Mariani M., Karki R., Spennato M. et al. Class III β -tubulin in normal and cancer tissues *Gene* 2015; 563: 2: 109–114.
35. Tischfield M.A., Baris H.N., Wu C. et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell* 2010; 140: 1: 74–87.
36. Katsetos C.D., Draber P. Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 19: 2778–2792.
37. Lewis S.A., Cowan N.J. Complex regulation and functional versatility of mammalian alpha- and beta-tubulin isotypes during the differentiation of testis and muscle cells. *J Cell Biol* 1988; 106: 6: 2023–2033.
38. Peknicova J., Kubatova A., Sulimenko V. et al. Differential subcellular distribution of tubulin epitopes in boar spermatozoa: recognition of class III-tubulin epitope in sperm tail. *Biol Reprod* 2001; 65: 672–679.
39. Locher H., Frijns J.H., Huisman M.A., de Sousa Lopes S.M. TUBB3: Neuronal Marker or Melanocyte Mimic? *Cell Transplant* 2014; 23: 11: 1471–1473.
40. Yu H., Fang D., Kumar S.M. et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 2006; 168: 6: 1879–1888.
41. Katsetos C.D., Del Valle L., Geddes J.F. et al. Localization of the neuronal class III beta-tubulin in oligodendrogliomas: comparison with Ki-67 proliferative index and 1p/19q status. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 4: 307–320.
42. Katsetos C.D., Del Valle L., Legido A. et al. On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pio del Rio Hortega and Moises Polak. *Acta Neuropathol.* 2003; 105: 1: 1–13.
43. Packer R.J., Sutton L.N., Rorke L.B. et al. Prognostic importance of cellular differentiation in medulloblastoma of childhood. *J Neurosurg* 1984; 61: 2: 296–301.
44. Ikota H., Kinjo S., Yokoo H. et al. Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol* 2006; 111: 5: 475–482.
45. Katsetos C.D., Del Valle L., Geddes J.F. et al. Aberrant localization of the neuronal class III beta-tubulin in astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 5: 613–624.
46. Katsetos C.D., Draber P., Kavallaris M. Targeting β III-tubulin in glioblastoma multiforme: from cell biology and histopathology to cancer therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11: 8: 719–728.
47. Jirásek T., Pisarikova E., Viklicky V. et al. Expression of class III beta-tubulin in malignant epithelial tumours: an immunohistochemical study using TU-20 and TuJ-1 antibodies. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 1: 41–45.
48. Kavallaris M., Kuo D.Y., Burkhart C.A. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* 1997; 100: 5: 1282–1293.
49. Mozzetti S., Ferlini C., Concolino P. et al. Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1: 298–305.
50. Ferrandina G., Zannoni G.F., Martinelli E. et al. Class III -Tubulin Overexpression Is a Marker of Poor Clinical Outcome in Advanced Ovarian Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 9: 2774–2779.
51. Su D., Smith S.M., Preti M. et al. Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel. *Cancer* 2009; 115: 11: 2453–2463.
52. Umezū T., Shibata K., Kajiyama H. et al. Taxol resistance among the different histological subtypes of ovarian cancer may be associated with the expression of class III beta-tubulin. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27: 2: 207–212.
53. Aoki D., Oda Y., Hattori S. et al. Overexpression of class III beta-tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4: 1473–1480.
54. Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E., Sørensen J.B. Longitudinal assessment of TUBB3 expression in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73: 1: 43–51.
55. Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E. S.J.B. Use of TUB β III for patient stratification and prognosis in lung cancer. *Lung Cancer Manag* 2015; 4: 2: 97–110.
56. Lebok P., Öztürk M., Heilenkötter U. et al. High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. *Oncol Lett* 2016; 11: 3: 1987–1994.
57. Kanojia D., Morshed R.A., Zhang L. et al. III-Tubulin Regulates Breast Cancer Metastases to the Brain. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 5: 1152–1161.
58. Urano N., Fujiwara Y., Doki Y. et al. Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer. *Int J Oncol* 2006; 28: 2: 375–381.
59. Gao J., Lu M., Yu J.W. et al. Thymidine Phosphorylase/ β -tubulin III expressions predict the response in Chinese advanced gastric cancer patients receiving first-line capecitabine plus paclitaxel. *BMC Cancer* 2011; 11: 1: 177.
60. Jirásek T., Cipro S., Musilová A. et al. Expression of class III beta-tubulin in colorectal carcinomas: an immunohistochemical study using TU-20 & TuJ-1 antibody. *Indian J Med Res* 2009; 129: 1: 89–94.
61. Sun H., Shi L., He X., Zheng S. Expressions of TUBB3 and gamma-synuclein in colorectal adenocarcinoma and their clinical significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2015; 95: 1242–1244.
62. Портянко А.С. Ремоделирование цитоскелета в патогенезе и прогрессии аденокарциномы и хронических воспалительных заболеваний толстой кишки: дис. ... д-ра. биол. наук: 14.03.02 Минск 2016: 43.
63. Egevad L., Valdman A., Wiklund N.P. et al. Beta-tubulin III expression in prostate cancer *Scand J Urol Nephrol* 2010; 44: 6: 371–377.
64. Ploussard G., Terry S., Maillé P. et al. Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. *Cancer Res* 2010; 70: 22: 9253–9264.
65. Hinsch A., Chaker A., Burdelski C. et al. β III-tubulin overexpression is linked to aggressive tumor features and genetic instability in urinary bladder cancer. *Hum Pathol* 2017; 61: 210–220.
66. Quaa A., Rahvar A.H., Burdelski C. et al. β III-tubulin overexpression is linked to aggressive tumor features and shortened survival in clear cell renal cell carcinoma *World J Urol* 2015; 33: 10: 1561–1569.
67. Ferrandina G., Martinelli E., Zannoni G.F. et al. Expression of class III beta tubulin in cervical cancer patients administered preoperative radiochemotherapy: correlation with response to treatment and clinical outcome. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 2: 326–330.
68. Koh Y., Kim T.M., Jeon Y.K. et al. Class III beta-tubulin, but not ERCC1, is a strong predictive and prognostic marker in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2009; 20: 8: 1414–1419.

69. Kaira K., Serizawa M., Koh Y. *et al.* Expression of Excision Repair Cross-Complementation Group 1, Breast Cancer Susceptibility 1, and β III-Tubulin in Thymic Epithelial Tumors. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 3: 606—613.
70. Akasaka K., Maesawa C., Shibasaki M. *et al.* Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 6: 1516—1526.
71. Miyamoto A., Akasaka K., Oikawa H. *et al.* Immunohistochemical study of HER2 and TUBB3 proteins in extramammary Paget disease. *Am J Dermatopathol* 2010; 32: 6: 578—585.
72. Ishida M., Kushima R., Okabe H. Aberrant expression of class III beta-tubulin in basal cell carcinoma of the skin. *Oncol Rep* 2009; 22: 4: 733—737.
73. Powell S., Kaizer A., Koopmeiners J.S. *et al.* High expression of class III β tubulin in small cell lung carcinoma. *Oncol Lett* 2013; 7: 2: 405—410.
74. Ting S., Mairinger F.D., Hager T. *et al.* ERCC1, MLH1, MSH2, MSH6, and betaIII-tubulin: resistance proteins associated with response and outcome to platinum-based chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. *Clin Lung Cancer* 2013; 14: 558—567.
75. Yoon S.O. *et al.* Class III beta-tubulin shows unique expression patterns in a variety of neoplastic and non-neoplastic lymphoproliferative disorders. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; 34: 5: 645—655.
76. Okuda K., Sasaki H., Dumontet C. *et al.* Expression of excision repair cross-complementation group 1 and class III beta-tubulin predict survival after chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 62: 1: 105—112.
77. Kang C.H., Jang B.G., Kim D.W. *et al.* The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and betaIII-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection. *Lung Cancer* 2010; 68: 3: 478—483.
78. Azuma K., Sasada T., Kawahara A. *et al.* Expression of ERCC1 and class III β -tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. *Lung Cancer* 2009; 64: 3: 326—333.
79. Ikeda S., Takabe K., Suzuki K. Expression of ERCC1 and class IIIbeta tubulin for predicting effect of carboplatin/paclitaxel in patients with advanced inoperable non-small cell lung cancer. *Pathol Int* 2009; 59: 12: 863—867.
80. Zhang Q., Zhu X., Zhang L. *et al.* A prospective study of biomarker-guided chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 74: 4: 839—846.
81. Chen X., Wu J., Lu H. *et al.* Measuring β -tubulin III, Bcl-2, and ERCC1 improves pathological complete remission predictive accuracy in breast cancer. *Cancer Sci* 2012; 103: 2: 262—268.
82. Leandro-García L.J., Leskelä S., Landa I. *et al.* Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67: 4: 214—223.
83. Ishida M., Kushima R., Okabe H. Aberrant expression of class III beta-tubulin in basal cell carcinoma of the skin. *Oncol Rep* 2009; 22: 4: 733—737.
84. Orfanidis K., Wäster P., Lundmark K. *et al.* Evaluation of tubulin β -3 as a novel senescence-associated gene in melanocytic malignant transformation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2017; 30: 2: 243—254.
85. Мамичев И.А., Бозуш Т.А., Дудко Е. А. и др. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии бета-III тубулина в опухолевой и окружающей нормальной ткани пациентов с мелкоклеточным раком легкого. *Росс биотер журнал.* — 2016. — Т. 15. — № 2. — С. 16—18. / Mamichev I.A., Bogush T.A., Dudko E. A. i dr. Immuofluorescentnyj analiz ehkspressii beta-III tubulina v opuholevoj i okruzhayushchej normal'noj tkani pacientov s nemelkokletochnym rakom legkogo. *Ross bioter zhurnal* 2016; 15: 2: 16—18. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мамичев Иван Андреевич — лаборант-исследователь лаборатории медицинской химии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

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

Бозуш Елена Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник, хирургическое отделение № 2 (диагностики опухолей), ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Терентьева Наталья Сергеевна — студентка, биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Полоцкий Борис Евсеевич — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник, хирургическое торакальное отделение, «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Давыдов Михаил Михайлович — д. м. н., член-корр. РАН, директор НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

Редакция обращает внимание авторов на следующие правила и форму представления рукописей для публикации в журнале «Антибиотики и химиотерапия».

1. Рукописи статей в 2 экз. (вместе с электронной версией текста на диске) с приложением в 2 экз. иллюстраций (в отдельном конверте) направляются по адресу: **113105 Москва, ул. Нагатинская, д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»**. Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон).

2. В выходных данных статьи указываются: название, инициалы, фамилии авторов, наименование учреждений, всех авторов, их должности, e-mail.

3. Статья печатается на одной стороне стандартного листа **через 1,5—2 интервала при ширине полей слева 3 см**.

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 60 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

5. Оригинальная статья должна включать (по порядку) следующие основные разделы: «**Резюме**» — не более 1 страницы; введение с кратким обзором литературы и постановкой цели исследования; «**Материал и методы**» — с детальным описанием объектов исследований, методических приёмов и квалификаций использованных реагентов (фирм-изготовителей); «**Результаты исследований**» и «**Обсуждение результатов**» или «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**» или «**Выводы**» (по пунктам); «**Литература**» — с указанием цитируемых источников.

6. Таблицы должны быть пронумерованы, **иметь название**, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте. Необщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть **сноски**.

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. На обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. **Подписи к рисункам делаются на отдельном листе** с указанием номера рисунка и его названия. Для графиков и диаграмм отмечается, **что дано по осям координат** на приведенных кривых и т. п.

8. В формулах должны быть чётко **размечены все элементы**: строчные (м) и прописные (М) буквы, синим подчеркнуты латинские буквы, красным — греческие (с вынесением разметки на поля), четко выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, О — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

9. **Сокращения слов, названий** (кроме общепринятых сокращений мер физических, химических, а также математических величин и терминов) **не допускаются**. Меры даются по Международной системе единиц (**СИ**) в русском обозначении, температура по шкале Цельсия.

10. Латинские названия микроорганизмов приводятся в соответствии с современной классификацией. При первом упоминании название микроорганизма дается полностью — род и вид (например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans*), при повторном упоминании **родовое название сокращается** до одной буквы (*E.coli*, *S.aureus*, *S.lividans*).

11. Названия генетических элементов даются в трёхбуквенном обозначении латинского алфавита строчными буквами, курсивом (*tet*), кодируемыми соответствующими генетическими элементами продукты — прописными прямыми буквами (TET).

12. В журнале используются **международные непатентованные названия** (МНН) препаратов. Торговые (патентованные) названия, под которыми препараты выпускаются различными фирмами, приводятся в разделе «Материал и методы», с указанием фирмы-изготовителя и их международным непатентованным названием.

13. Цитируемые источники литературы во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте и заключаются в квадратные скобки. В библиографическом описании указы-

ваются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, год, количество страниц.

14. Статьи, ранее опубликованные или направленные в какой-либо другой журнал или сборник, не должны присылаться.

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

**УДОБНО
ДЛЯ ВРАЧЕЙ!**



Универсальный противовирусный препарат

- широкий спектр действия
- высокий профиль безопасности
- прямое противовирусное действие
- индукция эндогенного интерферона
- большой опыт применения

Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой 150 мг, N 10, 20, 50.
P No01049/02 от 12.12.2007 раствор для в/в и в/м введения 125 мг/мл, 5 ампул по 2 мл.
P No01049/03 от 28.08.2007 линимент 5%, 5 мл, 30 мл P No01049/01 от 05.03.2010.

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

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

