

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 64



11-12'2019

Научно-практический журнал

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
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 2019

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 2019

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 64

11—12'2019

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора
Чл.-корр. РАН, профессор, д. б. н. Фирсов А. А.

Зам. главного редактора
профессор, д. м. н. Яковлев С. В.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Профессор, д. м. н. Белобородов В. А.
Академик РАН, профессор, д. б. н. Говорун В. М.
Профессор, д. б. н. Ильина Е. Н.
Профессор, д. м. н. Клишко Н. Н.
Профессор, д. м. н. Колбин А. С.
Профессор, д. м. н. Кочеровец В. И.
Академик РАН, профессор, д. м. н. Лобзин Ю. В.
Профессор, д. х. н. Олсуфьева Е. Н.
Д. б. н. Переверзева Э. Р.
Д. м. н. Припутневич Т. В.
Профессор, д. м. н. Руднов В. А.
Д. б. н. Садыкова В. С.
Д. х. н. Тевяшова А. Н.
Профессор, д. х. н. Тишков В. Н.
Чл.-корр. РАН, профессор, д. б. н. Тутельян А. В.
Профессор, д. м. н. Шляпников С. А.
Профессор РАН, д. х. н. Щекотихин А. Е.

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

**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

- Фролова В. В., Гурина С. В., Чернов Н. М., Яковлев И. П.
4,4а-дигидроксантоны как перспективные соединения
для создания новых антимикробных препаратов
Иванов И. С., Шаталов Д. О., Кедик С. А.,
Седишев И. П., Грамматикова Н. Э.,
Айдакова А. В., Трачук К. Н., Языкова Е. И.
Изучение действия фармацевтической
субстанции гидросукцинат разветвлённого
олигогексаметиленгуанидина
в отношении микроорганизмов
Крылова Н. В., Смолина Т. П., Берлизова М. В., Леонова Г. Н.
Иммунокорректирующая и противовирусная активность
полисахарида из морских бактерий
в отношении вируса клещевого энцефалита
Скарнович М.А., Скарнович М.О., Шишкина Л.Н.,
Бормотов Н.И., Рыжиков А.Б., Агафонов А.П.
Определение чувствительности штамма вируса гриппа
А(Н7N9) к противовирусным препаратам *in vitro* и *in vivo*
Логинова С. Я., Шукина В. Н.,
Борисевич С. В., Хамитов Р. А., Максимов В. А.
Изучение эффективности Ридостина®
при экспериментальной форме
тяжёлого острого респираторного синдрома

В помощь практикующему врачу

- Балоева Д. А., Этезова Ж. Б., Камбачокова З. А.,
Арамисова Р. М., Пищукова Е. М.,
Гурижева М. В., Габаева М. М.
Региональные особенности микробного пейзажа
в отделении реанимации и интенсивной терапии
Сердюкова Д. М., Шабанова Н. Е.,
Любасовская Л. А., Николаева А. В.,
Шмаков Р. Г., Скоробогатый А. В., Припутневич Т. В.
Современное состояние антибиотикорезистентности
оппортунистических патогенов и уровня потребления
антибактериальных препаратов в акушерском стационаре
федерального значения третьего уровня
Кузьмина А. В., Асецкая И. Л., Поливанов В. А., Зырянов С. К.
Медицинские ошибки при применении
бета-лактамов антибиотиков:
анализ российской базы спонтанных сообщений

Обзоры

- Беседнова Н. Н., Ермакова С. П., Кузнецова Т. А.,
Макаренкова И. Д., Крижановский С. П.,
Андрюков Б. Г., Запорожец Т. С.
Морские водоросли и сахарный диабет 2 типа:
новые стратегии в терапии
Коломиец В. М., Коваленко А. Л., Таликова Е. В.
Интенсификация этиотропной терапии
туберкулёза иммуномодуляторами
в условиях патоморфоза заболевания
Баева Е. С., Артюхов В. Г.
Пути реализации неантибактериальных
эффектов антибиотиков,
широко применяемых в клинической практике

Указатель авторов и статей, опубликованных в 2019 г.

Original Papers

- 3 Frolova V. V., Gurina S. V., Chernov N. M., Yakovlev I. P.
4,4A-Dihydroxanthones as Promising Compounds
for Creation of New Antimicrobials
8 Ivanov I. S., Shatalov D. O., Kedik S. A.,
Sedishev I. P., Grammatikova N. E.,
Aydaikova A. V., Trachuk K. N., Yazykova E. I.
Study of the Effect of the Pharmaceutical
Substance Branched Oligohexamethylene
Guanidine Hydrosuccinate
in Relation to Microorganisms
16 Krylova N. V., Smolina T. P., Berlizova M. V., Leonova G. N.
Immunocorrective and Antiviral Activity
of Polysaccharide from Marine Bacteria Against
Tick-Borne Encephalitis Virus
25 Skarnovich M. A., Skarnovich M. O., Shishkina L. N.,
Bormotov N. I., Ryzhikov A. B., Agafonov A. P.
Determination of Sensitivity of Influenza Virus Strain A(H7N9)
to Antiviral Drugs *In Vitro* and *In Vivo*
31 Loginova S. Ya., Shchukina V. N., Borisovich S. V.,
Hamitov R. A., Maksimov V. A.
Studying the Effectiveness of Ridostin®
in the Experimental Form
of Severe Acute Respiratory Syndrome

Guidelines for Practitioners

- 35 Baloeva D. A., Etezoza Zh. B., Kambachokova Z. A.,
Aramisova R. M., Pshukova E. M.,
Gurizheva M. V., Gabaeva M. M.
Regional Features of the Microbial Landscape
in the Intensive Care Unit
39 Serdyukova D. M., Shabanova N. E.,
Lyubasovskaya L. A., Nikolaeva A. V.,
Shmakov R. G., Skorobogatiy A. V., Pripitnevich T. V.
Contemporary State of Antibiotic Resistance
in Opportunistic Pathogens and the Extent
of Antibiotic Use in the Third-Level
Federal Obstetric Hospital
48 Kuzmina A. V., Asetskaya I. L., Polivanov V. A., Zyryanov S. K.
Medication Errors Associated
with Beta-Lactam Antibiotics:
Analysis of Russian Spontaneous Reporting Database

Reviews

- 54 Besednova N. N., Ermakova S. P., Kuznetsova T. A.,
Makarenkova I. D., Krizhanovsky S. P.,
Andryukov B. G., Sapozhetsk T. S.
Algae and Type 2 Diabetes:
New Treatment Strategies
68 Kolomiets V. M., Kovalenko A. L., Talikova E. V.
Immunomodulators in Maintenance Therapy
of Tuberculosis With Its Patomorphosis Features
Taken Into Consideration
72 Baeva E. S., Artyukhov V. G.
Ways to Implement Non-Antibacterial Effects
of Antibiotics Widely Used
in Clinical Practice

81 Index of Authors and Papers Published in 2019

* 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.

4,4а-дигидроксантоны как перспективные соединения для создания новых антимикробных препаратов

*В. В. ФРОЛОВА, С. В. ГУРИНА, Н. М. ЧЕРНОВ, И. П. ЯКОВЛЕВ

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург

4,4A-Dihydroxanthones as Promising Compounds for Creation of New Antimicrobials

*V. V. FROLOVA, S. V. GURINA, N. M. CHERNOV, I. P. YAKOVLEV

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg

С целью прогнозирования биологической активности новых производных 4,4а-дигидроксантиона была использована компьютерная программа PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), позволяющая предсказать спектр биологической активности химических соединений на основе анализа взаимосвязей «структура–активность». Производные 4,4а-дигидроксантиона были синтезированы на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета. В результате проведенного скрининга установлено, что 4,4а-дигидроксантоны могут проявлять антибактериальное, противогрибковое, противоопухолевое, противовирусное действие. Антимикробная активность полученных соединений была изучена в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Показано, что дигидроксантоны оказывали ингибирующее действие на грамположительные бактерии. Установлена взаимосвязь между строением производных и их противомикробной активностью. Наличие электроноакцепторных заместителей приводило к повышению активности, а электронодонорные заместители снижали антибактериальный эффект соединений. Было выявлено наиболее активное соединение — 5-бром-7-хлор-4,4а-дигидроксантон — обладающее активностью в отношении некоторых клинических штаммов стафилококков.

Ключевые слова: ксантоны, дигидроксантоны, противомикробная активность, структура–активность, клинические штаммы стафилококков, VITEK 2 COMPACT 60.

In order to predict the biological activity of the new derivatives of 4,4a-dihydroxanthone, the PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) computer program was used. It allows predicting the biological activity spectrum of chemical compounds based on the analysis of structure–activity interrelation. Derivatives of 4,4a-dihydroxanthone were synthesized at the Department of Organic Chemistry of the Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University. As a result of the screening, it was found that 4,4a-dihydroxanthones can exhibit antibacterial, antifungal, antitumor, and antiviral effects. Antimicrobial activity of the obtained compounds was studied against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungi. Dihydroxanthones were shown to have an inhibitory effect on Gram-positive bacteria. Relationship between the structure of derivatives and their antimicrobial activity is established. The presence of electron-withdrawing substituents led to an increase in activity, and electron-donating substituents reduced the antibacterial effect of the compounds. The most active compound, 5-bromo-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone, was found to be active against certain clinical strains of staphylococci.

Keywords: xanthones, dihydroxanthones, antimicrobial activity, structure–activity, clinical strains of staphylococci, VITEK 2 COMPACT 60.

Введение

Ксантоны — многочисленная группа гетероциклических соединений природного и синтетического происхождения, интерес к которым вызван широким спектром оказываемого ими фармакологического действия (рис. 1). Они обладают антибактериальным, противогрибковым, противомалярийным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиоксидантным, антигистаминным, кардиотоническим действием, а также стимулируют центральную нервную систему [1].

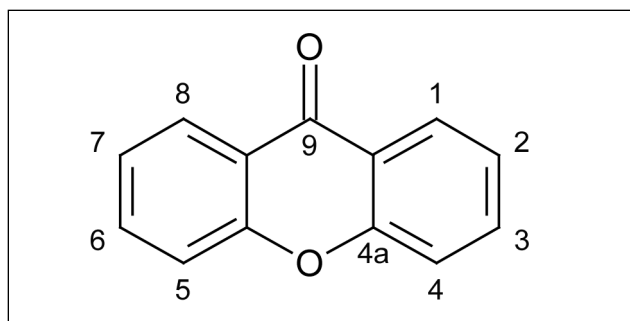


Рис. 1. Структурная формула ксантона.

Гораздо менее изучены частично гидрированные производные ксантона — дигидроксантоны (рис. 2). Они представляют интерес в связи с их фармакологическими свойствами.

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции:

E-mail: Zhilyaeva.valeriya@pharminnotech.com

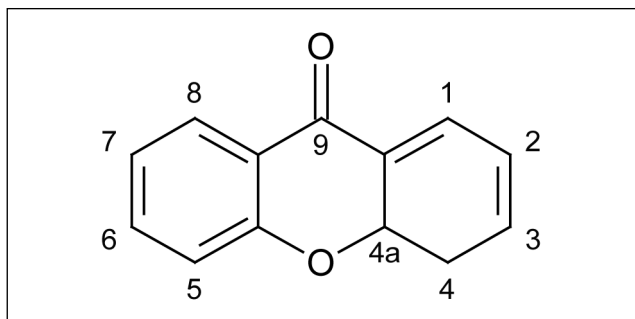


Рис. 2. Структурная формула 4,4а-дигидроксанта.

Из данных литературы известно, что в 1994 г. из гриба *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*) было выделено производное 4,4а-дигидроксанта — нидулалин А (рис. 3), а в 1997 г. из гриба *Penicillium* sp. были выделены два новых производных нидулалина А — F390В и F390С (см. рис. 3). Показано, что эти соединения обладают мощным цитотоксическим действием [2].

Исследование культур гавайского изолята *Phoma* sp. привело к открытию симметричных димеров 4,4а-дигидроксанта — фомалевона А и фомалевона С (рис. 4). У них обнаружена антибактериальная активность в отношении *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*. Фомалевон С также проявил противогрибковую активность в отношении *Aspergillus flavus* и *Fusarium verticillioides* [3].

На кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ) ведётся синтез 4,4а-дигидроксантонов и изучение их физико-химических свойств [4]. Структурное сходство синтетических 4,4а-дигидроксантонов с соединениями природного происхождения — нидулалином А и фомалевона А и С, обладающими цитотоксическим и противомикробным действием, — делает данный класс соединений перспективным для изучения биологической активности.

Поэтому на первом этапе исследования целью является изучение противомикробной активности производных дигидроксанта, установление связи структура—активность и выявление наиболее активного соединения.

Материал и методы

На кафедре органической химии СПХФУ были синтезированы новые производные 4,4а-дигидроксанта с разными заместителями в ароматическом кольце (рис. 5) [4].

Для прогнозирования и определения предполагаемой биологической активности производных 4,4а-дигидроксанта использовали компьютерную программу PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), которая позволяет предсказать спектр биологической активности химических соединений на основе анализа взаимосвязей «структура—активность».

Антимикробную активность данных производных исследовали методом двукратных серийных разведений в жидких питательных средах с последующим высевом на плотные питательные среды [5]. Определяли минимальные ингибирующие цид-

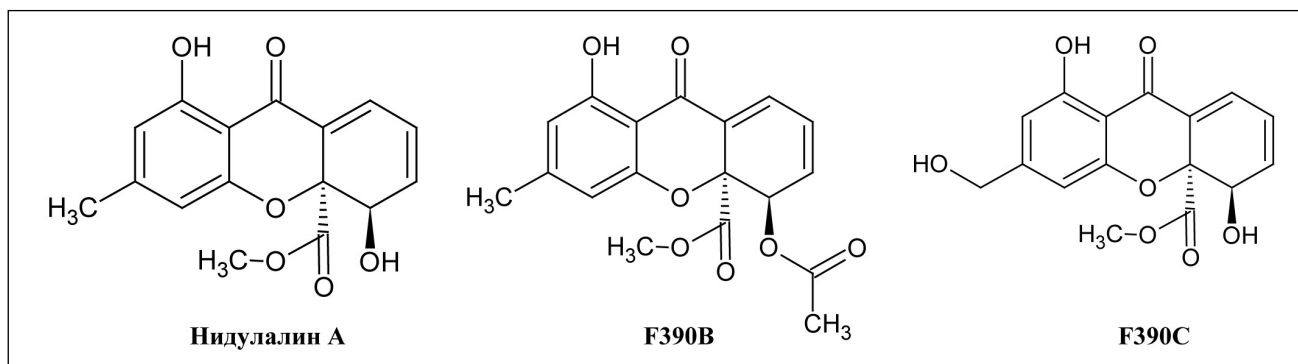


Рис. 3. Нидулалин и его производные.

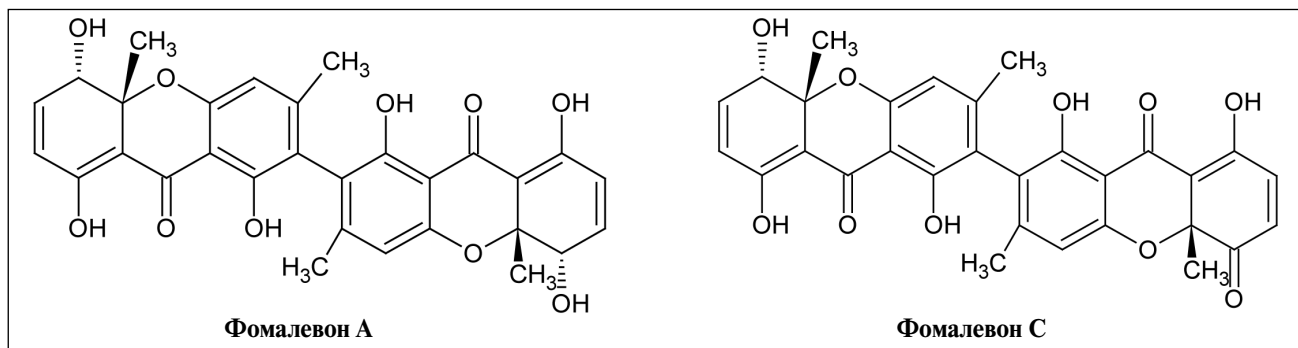


Рис. 4. Фомалевон А и фомалевон С.

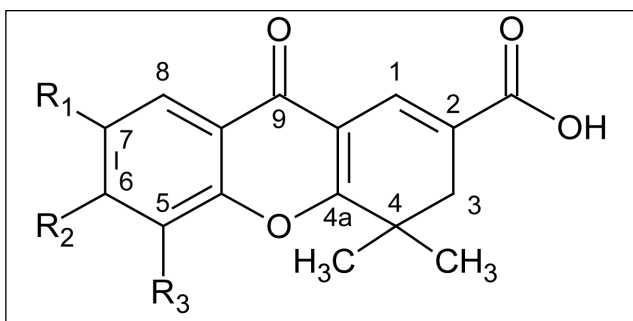


Рис. 5. Структурная формула синтезированных производных 4,4а-дигидроксанта.

ные (МЦК) и статические концентрации (МСК) соединений. В качестве тест-культур использовали грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* Д1404, резистентный к бензилпенициллину, метициллинорезистентный штамм *S. aureus* (MRSA), *Staphylococcus haemolyticus*, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Mycobacterium* sp. K8, *Corynebacterium glutamicum* H-46 и грамотрицательную бактерию *Escherichia coli* ATCC 25922. Для определения противогрибковой активности использовали дрожжи *Candida albicans* РКПГУ401.

Результаты

В результате проведенного скрининга с помощью программы PASS установлено, что 4,4а-дигидроксантоны обладают противоопухолевым, противовирусным, антибактериальным, противогрибковым действием, а также ингибируют высвобождение гистамина.

При исследовании противомикробной активности на первом этапе в качестве тест-культур использовали *S. aureus*, *B. cereus*, *Mycobacterium* sp., *C. glutamicum*, *E. coli* и *Candida albicans*.

В качестве препаратов сравнения были выбраны антибиотики ванкомицин, обладающий

выраженной антистафилококковой активностью и доксициклин, схожий по структуре с дигидроксантами.

Все синтезированные производные дигидроксанта оказались малоактивны в отношении грамотрицательной культуры *E. coli* и дрожжей *C. albicans* (МЦК 125–250 мкг/мл).

При исследовании антимикробного действия производных в отношении *S. aureus* установлено, что соединение *l* (5-бром-7-хлор-4,4а-дигидроксанта) оказывало выраженное статическое (МСК — 2 мкг/мл) и цидное (МЦК — 4 мкг/мл) антистафилококковое действие, схожее с активностью ванкомицина (МЦК — 2 мкг/мл) и превышающее активность доксициклина (МЦК — 8 мкг/мл) (табл. 1).

Соединения *k* (5,7-дибром-4,4а-дигидроксанта) и *o* (5-бром-6,7-диметил-4,4а-дигидроксанта) оказывали заметное статическое и цидное действие на стафилококк (МСК — 4 мкг/мл, МЦК — 8–16 мкг/мл), схожее с действием доксициклина (табл. 1).

При исследовании антимикробной активности в отношении *B. cereus* установлено, что соединения *k* (5,7-дибром-4,4а-дигидроксанта), *l* (5-бром-7-хлор-4,4а-дигидроксанта) и *o* (5-бром-6,7-диметил-4,4а-дигидроксанта) оказывали выраженное цидное действие (МЦК — 8 мкг/мл, 4 мкг/мл и 4 мкг/мл, соответственно), схожее с препаратами сравнения. Соединение *q* (5,7-дибром-6-метокси-4,4а-дигидроксанта) проявляло умеренное подавляющее действие на *B. cereus* в концентрации 16 мкг/мл. Остальные дигидроксантоны были менее активны (МЦК — 32–125 мкг/мл) (см. табл. 1).

Выявлено, что производные 4,4а-дигидрок-

Таблица 1. Противомикробная активность производных 4,4а-дигидроксанта в отношении грамположительных бактерий

Производные 4,4а-дигидроксанта	Минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл							
	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>Mykobacterium</i> sp.		<i>C. glutamicum</i>	
	МСК	МЦК	МСК	МЦК	МСК	МЦК	МСК	МЦК
A	8	32	—	62,5	—	16	32	62,5
B	8	32	—	32	8	32	32	62,5
C	16	32	—	32	16	32	32	62,5
D	62,5	125	—	62,5	16	32	32	62,5
E	32	62,5	—	32	—	62,5	—	125
F	62,5	125	62,5	125	—	62,5	—	125
G	62,5	250	62,5	125	16	32	—	62,5
H	62,5	250	—	62,5	32	62,5	62,5	125
I	16	32	—	62,5	—	62,5	—	62,5
J	32	62,5	—	32	—	16	16	32
K	4	8	—	8	—	2	4	8
L	2	4	—	4	1	2	2	4
M	16	32	—	32	8	16	32	62,5
N	4	32	16	32	—	8	16	32
O	4	16	—	4	4	8	8	16
P	—	62,5	—	62,5	—	62,5	—	62,5
Q	4	32	—	16	—	8	8	16
Ванкомицин	—	2	—	2	—	2	—	2
Доксициклин	0,5	8	0,5	4	0,25	1	0,25	2

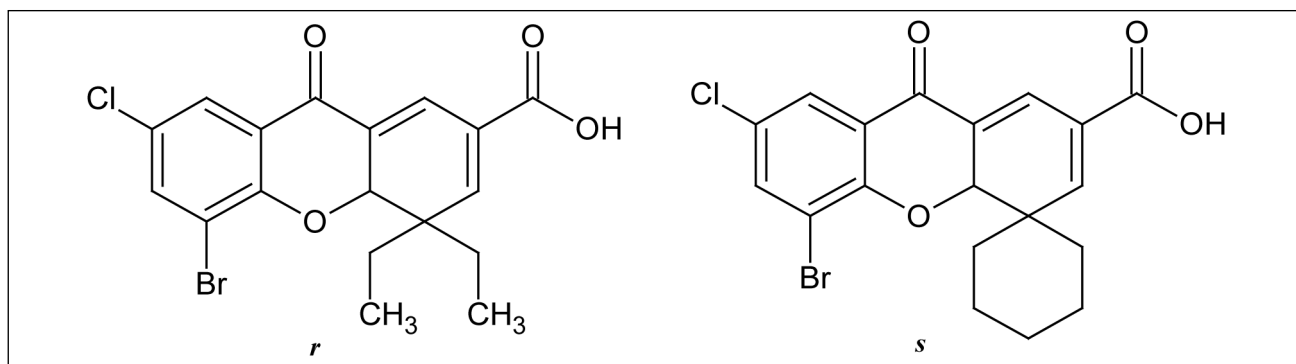


Рис. 6. Структурная формула соединений *r* и *s*.

Таблица 2. Противомикробная активность производных 4,4а-дигидроксантона *r* и *s*

Тест-микроорганизмы	Минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл					
	Соединение <i>r</i>		Соединение <i>s</i>		Ванкомицин	
	МСК	МЦК	МСК	МЦК	МСК	МЦК
<i>S.aureus</i>	8	16	4	8	—	2
<i>B.cereus</i>	—	4	—	4	—	2
<i>Mycobacterium</i> sp.	—	4	—	4	0,5	1
<i>C.glutamicum</i>	8	16	4	8	—	2
<i>E.coli</i>	—	500	—	500	—	—
<i>C.albicans</i>	125	250	63	125	—	—

сантаона *k* (5,7-дибром-4,4а-дигидроксантон) и *l* (5-бром-7-хлор-4,4а-дигидроксантон) оказывали выраженное статическое (МСК — 1–4 мкг/мл) и цидное (МЦК — 2–8 мкг/мл) действие на *Mycobacterium* sp. и *Corynebacterium glutamicum*, сравнимое с ванкомицином и доксициклином. Остальные соединения были менее активны (МЦК — 16–125 мкг/мл) (см. табл. 1).

Установлена закономерность между строением дигидроксантонов и антимикробной активностью в отношении грамположительных культур.

Наличие электроноакцепторных заместителей приводило к повышению активности, а электронодонорные заместители снижали антимикробный эффект соединений. Введение в седьмое положение хлора, брома, фтора или нитрогруппы незначительно увеличивало антимикробную активность соединений. Метильная группа в шестом и седьмом положениях снижала антимикробный эффект. Введение метоксигруппы в седьмое положение незначительно увеличивало активность. Введение в молекулу дигидроксантона второго галогена, а именно брома в 5-е положение, увеличивало антимикробную активность соединений в 10 раз.

Было выявлено наиболее активное соединение в отношении грамположительных культур — 5-бром-4-диметил-7-хлор-4,4а-дигидроксантон.

С помощью дальнейшей химической модификации активного соединения были получены два новых производных дигидроксантона — *r* и *s* (рис. 6) и изучена их антимикробная активность (табл. 2).

Модифицированные соединения также оказались малоактивны в отношении *E. coli* (МЦК —

500 мкг/мл) и дрожжей *C.albicans* (МЦК — 125–250 мкг/мл).

В отношении грамположительных культур производные проявили умеренную активность.

На следующем этапе исследования была изучена противомикробная активность наиболее активных соединений *k*, *l*, *r*, *s* в отношении клинических штаммов стафилококков: *S.aureus* Д1404 (резистентный к бензилпенициллину), метициллинорезистентный *S.aureus* (MRSA) и *S.epidermidis* (устойчивый к бензилпенициллину, цефокситину, эритромицину, гентамицину, левофлоксацину, норфлоксацину) (табл. 3).

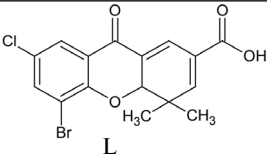
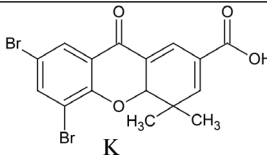
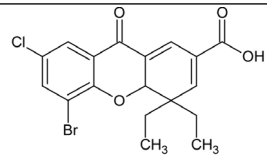
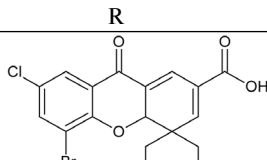
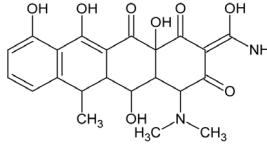
С помощью анализатора VITEK 2 COMPACT 60 была проведена видовая идентификация клинических штаммов стафилококков и обнаружено, что *S.epidermidis* с точностью 99% относится к *S.haemolyticus*.

Соединения проявили умеренную активность в отношении клинического золотистого стафилококка Д1404, резистентного к бензилпенициллину. МЦК составила 16–32 мкг/мл, как и у одного из препаратов сравнения — доксицилина (МЦК — 32 мкг/мл).

На метициллинорезистентный стафилококк оказало выраженное действие соединение 5-бром-4-диметил-7-хлор-дигидроксантон (*l*) и 5,7-дибромдигидроксантон (*k*) (МСК — 4 мкг/мл, МЦК — 8 мкг/мл), схожее с действием ванкомицина (МЦК — 4 мкг/мл) и превышающее по активности доксицилин (МЦК — 32 мкг/мл).

Соединение 5-бром-4-диметил-7-хлор-дигидроксантон (*l*) проявило выраженную активность в отношении гемолитического стафилококка, ус-

Таблица 3. Противомикробная активность производных дигидроксанта в отношении клинических штаммов стафилококка

Соединение	Минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл					
	<i>S.aureus</i> Д1404		MRSA		<i>S.haemolyticus</i>	
	МСК	МЦК	МСК	МЦК	МСК	МЦК
 L	8	16	4	8	0,5	1
 K	16	32	4	8	2	4
 R	16	32	16	32	—	16
 S	8	16	8	16	2	4
Ванкомицин	—	4	—	4	2	4
Доксициклин	0,5	32	4	32	1	8
						

тойчивого к ряду антибиотиков (МЦК — 1 мкг/мл), превышающую активность ванкомицина и доксициклина.

Заключение

5-Бром-4-диметил-7-хлор-дигидроксантаон (I) был выбран как перспективный антимикробный агент.

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что получен новый перспективный класс противомикробных агентов — 4,4а-дигидрок-

сантонов. Дальнейшее изучение данных соединений и их модификация позволит повысить их эффективность.

Грант Комитета по науке и высшей школе (КНВШ) — конкурс грантов для студентов ВУЗов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов ВУЗов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, 2018 год, ПСП № 18729, тема гранта «Производные 4,4а-дигидроксантаона в создании новых противомикробных средств».

ЛИТЕРАТУРА

1. Pinto M.M.M., Sousa M.E., Nascimento M.S.J. Xanthone Derivatives: New Insights in Biological Activities. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2517–2538.
2. Kye-Simeon Masters, Bräse S. Xanthenes from Fungi, Lichens, and Bacteria: The Natural Products and Their Synthesis. *Chem Rev* 2012; 112 (Suppl 7): 3717–3776. doi: 10.1021/cr100446h.
3. Shim S.H., Baltrusaitis J., Gloer J.B., Wicklow D.T. Phomalevones A.-C. Dimeric and Pseudodimeric Polyketides from a Fungicolous Hawaiian

Isolate of Phoma sp. (Cucurbitariaceae). *J Nat Prod* 2011; 74 (Suppl 3): 395–401. doi: 10.1021/np100791b.

4. Chernov N.M., Shutov R.V., Sharoyko V.V., Kuz'mich N.N., Belyakov A.V., Yakovlev I.P. Synthetic Route to 4,4a- and 3,4-Dihydroxanthones through [4+2] Cycloaddition and Base-Assisted Sigmatropic Rearrangement. *Eur J Org Chem* 2017; 19: 2836–2841. doi.org/10.1002/ejoc.201700310.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. — 944 с. / Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya. M.: Grif i K, 2012; 944. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фролова Валерия Владимировна — аспирант кафедры микробиологии СПХФУ, Санкт-Петербург

Гурина Светлана Владимировна — к. б. н., доцент кафедры микробиологии СПХФУ, Санкт-Петербург

Чернов Никита Максимович — к. х. н., научный сотрудник лаборатории синтеза СПХФУ, Санкт-Петербург

Яковлев Игорь Павлович — д. х. н., зав. кафедрой органической химии СПХФУ, профессор кафедры органической химии СПХФУ, Санкт-Петербург

Изучение действия фармацевтической субстанции гидросукцинат разветвлённого олигогексаметиленгуанидина в отношении микроорганизмов

*И. С. ИВАНОВ^{1,2}, Д. О. ШАТАЛОВ^{1,2}, С. А. КЕДИК^{1,2}, И. П. СЕДИШЕВ^{1,2}, Н. Э. ГРАММАТИКОВА¹, А. В. АЙДАКОВА^{1,2}, К. Н. ТРАЧУК¹, Е. И. ЯЗЫКОВА¹

¹ МИРЭА — Российский технологический университет, Москва

² АО «Институт фармацевтических технологий», Москва

Study of the Effect of the Pharmaceutical Substance Branched Oligohexamethylene Guanidine Hydrosuccinate in Relation to Microorganisms

*I. S. IVANOV^{1,2}, D. O. SHATALOV^{1,2}, S. A. KEDIK^{1,2}, I. P. SEDISHEV^{1,2}, N. E. GRAMMATIKOVA¹, A. V. AYDAKOVA^{1,2}, K. N. TRACHUK¹, E. I. YAZYKOVA¹

¹ MIREA — Russian Technological University, Moscow

² Institute of pharmaceutical technologies, Moscow

Приобретение микроорганизмами резистентности по отношению к применяемым антибиотикам и антибактериальным агентам ставит задачу поиска новых активных дезинфектантов. Известно, что соединения класса олигогуанидины обладают ярко выраженными антибактериальными свойствами, низкой токсичностью и могут проявлять продолжительное биоцидное действие, вызывающее деструкцию биоплёнок, формируемых патогенной микрофлорой. Одним из таких соединений является гидросукцинат разветвлённого олигогексаметиленгуанидина (ОГМГсукц). Указанное соединение может быть использовано в качестве активного компонента при разработке лекарственного средства, действующего на микробные дегидрогеназы, для профилактики и лечения конъюнктивитов инфекционной природы, в связи с чем целью настоящего исследования являлось исследование и визуализация механизма действия ОГМГсукц в отношении микробных дегидрогеназ грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* колориметрическими методами, изучение его действия на формирование биоплёнки и зрелую биоплёнку *Escherichia coli*, на её клеточную стенку методом сканирующей электронной микроскопии, а также экспериментальное доказательство влияния ОГМГсукц на морфологию нескольких видов бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, вызывающих конъюнктивит, методом атомно-силовой микроскопии. Помимо этого, требовалось выявить зависимость нарушения сегрегации клеток от возрастающей концентрации ОГМГсукц. Таким образом, было доказано, что ОГМГсукц оказывает влияние не только на микробные дегидрогеназы некоторых грамотрицательных бактерий, зрелую биоплёнку кишечной палочки, но и на её клеточную стенку. Также выявлено действие ОГМГсукц на морфологию нескольких видов бактерий, грибов дрожжей и плесени. Указанная информация свидетельствует о том, что создание антимикробного препарата на основе ОГМГсукц представляет интерес, и эта работа может послужить основой для разработки инновационного фармакологического препарата для лечения конъюнктивитов инфекционной природы.

Ключевые слова: антибактериальный агент, биоплёнка, конъюнктивит, механизм действия, микробные дегидрогеназы, офтальмология, возбудители.

The acquisition of resistance to the antibiotics and antibacterial agents used by microorganisms sets the task of finding new active disinfectants. It is known that compounds of the oligoguanidine class possess pronounced antibacterial properties, low toxicity, and can exhibit a prolonged biocidal effect, causing destruction of biofilms formed by pathogenic microflora. One of these compounds is branched oligohexamethylene guanidine hydrosuccinate (OHMG succ). The specified compound can be used as an active component in the development of a drug that acts on microbial dehydrogenases for the prevention and treatment of conjunctivitis of an infectious nature. In this regard, the purpose of this work is to study and visualize the mechanism of action of OHMG succ in relation to microbial dehydrogenases of Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by colorimetric methods, to study its effect on the formation of biofilms and mature biofilms of *E. coli*, on its cell wall by scanning electron microscopy, as well as experimental evidence of the influence of OHMG succ on the morphology of several types of bacteria, yeasts, and molds that cause conjunctivitis, by atomic force microscopy. In addition, it was necessary to identify the dependence of cell segregation disturbance on the increasing concentration of OHMG succ. Thus, it was proved that OHMG succ affects not only the microbial dehydrogenases of certain Gram-negative bacteria, the mature biofilm of *E. coli*, but also its cell wall. The effect of OHMG succ on the morphology of several types of bacteria, yeast and mold fungi was also revealed. The indicated information shows that the creation of an antimicrobial drug based on OHMG succ is of interest, and this work may serve as the basis for the development of an innovative pharmacological drug for the treatment of conjunctivitis of an infectious nature.

Keywords: antibacterial agent, biofilm, conjunctivitis, mechanism of action, microbial dehydrogenases, ophthalmology, pathogens.

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 119571 Москва, Проспект Вернадского, д. 86. МИРЭА

Наименование. Гидросукцинат разветвлённого олигогексаметиленгуанидина. Международное непатентованное название (МНН): олиго (иминокарбонимидоилимино-1,6-гександиил) гидросукцинат.

Внешний вид. Белый кристаллический порошок. Производитель: АО «Институт фармацевтических технологий», Москва, Россия.

Тест-система. В экспериментах были использованы культуры клинических штаммов микроорганизмов из коллекции лаборатории биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи: *E.coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* PA103, *P.aeruginosa* Z720-17R, *Staphylococcus aureus* R 116-14, *Staphylococcus epidermidis* R194-18, *Candida albicans* G21-0218, *Aspergillus niger* F503-18.

Подготовка препарата и выбор доз. ОГМГсукц растворяли в воде в концентрации 100 мг/мл и хранили при +4°C. Рабочие разведения ОГМГсукц готовились в воде, физрастворе или PBS (натрий-фосфатный буфер) [14] перед каждым экспериментом.

Дизайн исследования для экспериментов с использованием колориметрических методов восстановления красителей *in vivo*. Для визуализации действия фармакологической субстанции ОГМГсукц на бактерии был использован тест на восстановление красителей дегидрогеназами живых клеток. Живые клетки обладают способностью изменять окраску добавленного раствора красителя. В экспериментах применялись красители: метиленовая синька (Difco Laboratories, Detroit, MI, США) (далее МС) и 2,3,5-трифенилтетразолий бромид (Lachema, Phan Erba Lachema s.r.o., Чешская Республика) (далее ТФТБ). Восстановление красителей живыми клетками приводит к образованию окрашенных соединений: в случае ТФТБ — красно-фиолетовых кристаллов формазана, в случае МС — к обесцвечиванию раствора.

В работе использовали грамотрицательные бактерии *E.coli* K12 и *P.aeruginosa* PA103.

Ночные культуры бактерий в Л-бульоне [14] засеивали в свежую среду в соотношении 1:10 и выращивали с аэрацией в течение 2,5 ч при 37°C (для *E.coli*) и 35°C (для *P.aeruginosa*). Суспензии бактерий разводили пополам буфером PBS (pH 7,0), разливали по 180 мкл в лунки 96-луночного планшета, добавляли по 20 мкл красителя, растворенного в PBS (ТФТБ до конечной концентрации 50 мкг/мл, МС — 35 мкг/мл).

Готовили серию разведений препарата ОГМГ (исходно — 2 мг/мл) в 2 раза и вносили в лунки по 10 мкл. Таким образом, концентрация препарата в лунках составляла 100, 50, 25 и 12,5 мкг/мл.

Планшеты инкубировали при 37°C в течение 2 ч или 18 ч в темноте, измеряли оптическую плотность при 450 нм с помощью спектрофотометра Multiskan FC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США).

Дизайн исследования для экспериментов по изучению действия фармацевтической субстанции ОГМГсукц на формирование биоплёнки и зрелую биоплёнку. В опыте были использованы бактерии *E.coli* K12 LBG1623 (лабораторный штамм).

Ночную культуру бактерий в Л-бульоне засеивали в соотношении 1:100 в синтетическую среду М9 [14] с 0,4% казеиновых кислот в качестве источника углерода и необходимыми добавками.

При изучении воздействия препарата на формирование биоплёнок суспензию бактерий разливали по 200 мкл в лунки 96-луночного планшета. В лунки добавляли различные концентрации препарата и помещали планшет в термостат при 35°C. Через 18 ч инкубации отбирали аликвоты планктонной культуры, измеряли оптическую плотность при 620 нм с помощью спектрофотометра ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, США). Биоплёнку, сформированную в лунках планшета, окрашивали с помощью кристаллвиолета (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, США), растворяли в 32% уксусной кислоте и определяли оптическую плотность при 550 нм.

Влияние препарата на зрелую биоплёнку определяли следующим образом: по 200 мкл бактериальной суспензии разли-

вали в лунки 96-луночного планшета и инкубировали 18 ч при 35°C. Отбирали планктонную фракцию, добавляли по 200 мкл свежей среды М9 с добавками и различные концентрации препарата. Планшет инкубировали 18 ч, отбирали планктонную фракцию, а оставшуюся в лунках биоплёнку окрашивали с помощью кристаллвиолета, растворяли в 32% уксусной кислоте и определяли оптическую плотность раствора при 550 нм.

Дизайн исследования для экспериментов по изучению влияния фармацевтической субстанции ОГМГсукц на клеточную стенку бактерий *E.coli* K12 методом сканирующей электронной микроскопии.

Получение препаратов планктонной культуры. Ночную культуру *E.coli* в Л-бульоне разводили в 10 раз свежим бульоном и подращивали с аэрацией при 37°C в течение 2 ч. Вырастившую суспензию разделяли на 3 части: первая служила контролем, в две другие добавляли исследуемую субстанцию до конечных концентраций 8 и 40 мкг/мл. Пробы выдерживали с перемешиванием при 37°C в течение 1 ч, клетки осаждали центрифугированием и суспендировали в 10% растворе формальдегида. Полученные препараты использовали для электронной микроскопии.

Получение покровных стекол с биоплёнками, выращенными при разных концентрациях препарата, для дальнейшей микроскопии. Ночную культуру *E.coli* в Л-бульоне засеивали в среду М9 с казеиновыми кислотами и необходимыми добавками (1:100). По 100 мкл полученной суспензии наносили на стерильные покровные стёкла и инкубировали 18 ч при 35°C в термостате. Капли с планктонной культурой отбрасывали и на их место наносили по 100 мкл свежей М9 с ростовыми добавками. В капли вносили фармацевтическую субстанцию ОГМГсукц в субингибирующей концентрации 2 мкг/мл и минимальной ингибирующей концентрацией (далее МИК) 8 мкг/мл. Контрольные пробы не содержали ОГМГсукц. Стёкла инкубировали 18 ч при 35°C, промывали водой и помещали в 10% раствор формальдегида. Полученные препараты использовали для сканирующей электронной микроскопии.

Дизайн исследования для экспериментов по изучению влияния фармацевтической субстанции ОГМГсукц на морфологию микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии.

Тест-штаммы микроорганизмов, использованные в работе: *S.aureus* R 116-14, минимальная бактерицидная концентрация (МБК) 32 мг/л, *S.epidermidis* R194-18 (МБК 16 мг/л), *P.aeruginosa* Z720-17R (МБК 32 мг/л), *C.albicans* G21-0218 (МБК 2 мг/л), *A.niger* F503-18 (МБК н/о).

Культуры бактерий инкубировали на кровяном агаре в течение 24 ч при 36°C, культуры грибов — на агаре Сабуро в тех же условиях (кроме *A.niger* — 72 ч при 28°C). По окончании инкубации культуры суспендировали в физрастворе до финальной плотности суспензии порядка 10⁶ КОЕ/мл. Суспензию бактерий смешивали с равным объёмом водного раствора ОГМГсукц или воды (контроль) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Использовали растворы ОГМГсукц с концентрацией 100 мг/л и 40 мг/л. После инкубации 5 мкл суспензии наносили на свежесколотую слюду и высушивали. Полученные препараты помещали в индивидуальные чашки Петри. Приготовленные таким образом образцы исследовали на атомно-силовом микроскопе «ФемтоСкан» (ООО НПЦ «Центр перспективных технологий», Москва, Российская Федерация) в контактном режиме с кантилеверами CSG01.

Результаты исследования

Изучение действия фармацевтической субстанции ОГМГсукц на живые клетки грамотрицательных бактерий *E.coli* K12 и *P.aeruginosa* PA103 с использованием колориметрических методов восстановления красителей *in vivo*. Восстановление красителей живыми клетками приводит к образованию окрашенных соединений: в случае ТФТБ — красно-фиолетовых кристаллов формазана, в случае МС — к обесцвечиванию раствора.

Результаты экспериментов представлены на рис. 2 а, б. На рис. 2 а хорошо заметно, как изменяется цвет раствора в лунках в зависимости от концентрации добавленного к бактериям ОГМГсукц после 2 ч инкубации.

Результаты сканирующей электронной микроскопии клеток *E.coli* K12 (лабораторный штамм) после обработки планктонной культуры и биоплёнок фармацевтической субстанцией ОГМГсукц. Образцы готовили в соответствии с методами исследования. Результаты сканирующей электронной микроскопии клеток приведены на рис. 3 а–г.

На рис. 3 а показано влияние ОГМГсукц на культуру планктона *E.coli*, что проявляется в нарушении клеточного деления и выпячивания клеточной стенки. С увеличением концентрации ОГМГсукц нарушения клеточной стенки становятся гораздо более выраженными.

При субингибирующих концентрациях ОГМГсукц (рис. 3 в) наблюдается более активное образование микроколоний, чем в контроле. Когда концентрация ОГМГсукц равна МИК, отдельные клетки с нарушенной морфологией остаются в поле зрения (рис. 3 г).

Результаты исследования влияния фармацевтической субстанции ОГМГсукц на морфологию микроорганизмов. Чтобы изучить влияние исследуемой фармацевтической субстанции на морфологию бактериальных клеток, бактерии инкубировались с 40 мкг/мл ОГМГсукц, 100 мкг/мл ОГМГсукц и без ОГМГсукц (контроль) в течение 15 мин, затем образцы наносились на слайд, высушивались и исследовались с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ).

На рис. 4 а–е приведены результаты АСМ для *S.epidermidis* R194-18, *S.aureus* R 116-14 и *P.aeruginosa* Z720-17R.

Из результатов проведённой АСМ видно, что на рис. 4 б образцы бактерий представлены гладкими плотными колониями, без видимых нарушений оболочек, на рис. 4 в в составе колонии показаны шаровидные бактерии. На рис. 4 в и рис. 4 г бактерии идентифицированы небольшими группами, хотя плотные скопления бактерий обнаружены, единичные образцы не встречаются, структурное повреждение мембран не определено.

Как и в случае *S.epidermidis*, влияние ОГМГсукц на структуру бактерий выражается в их стремлении плотнее объединяться в колонии, что обеспечивает их выживаемость.

На рис. 4 д показано много отдельных объектов по сравнению с образцом, обработанным концентрацией 40 мг/л (рис. 4 е). Очевидных повреждений мембран не наблюдается, однако, сегрегационные нарушения являются выраженными.

Результаты АСМ для грибов рода *C.albicans* G21-0218 и *A.niger* F503-18 показаны на рис. 5 а–г.

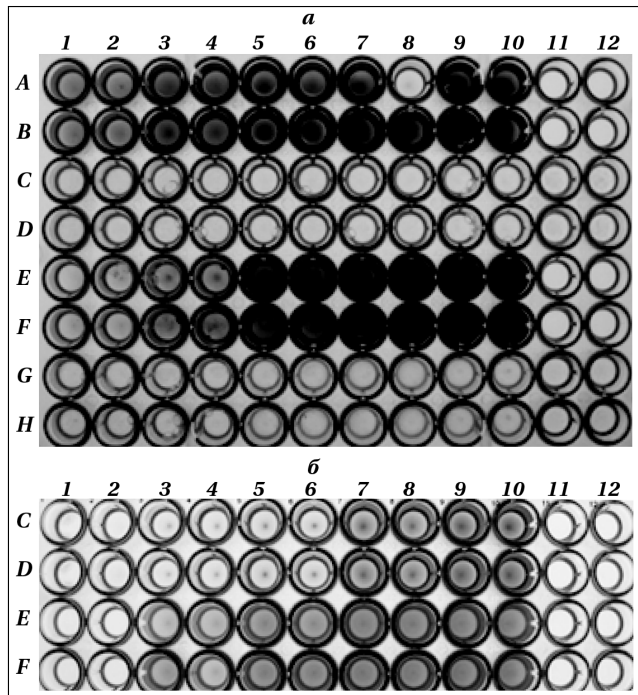


Рис. 2. Действие фармацевтической субстанции ОГМГсукц на бактерии *E.coli* и *P.aeruginosa*.

а – 2 ч инкубации. Линии А – D – *E.coli*; линии Е – Н – *P.aeruginosa* PA103. Концентрация ОГМГсукц в 1–2 рядах составила 100 мкг/мл; в 3–4 – 50 мкг/мл; в 5–6 – 25 мкг/мл; в 7–8 – 12,5 мкг/мл; в 9–10 – контроль с отсутствием субстанции; в 11–12 – контроль среды с красителем без бактерий. Линии А, В, Е, F – краситель ТФТБ; линии С, D, G, H – краситель МС. б – 18 ч инкубации. Линии С–D – *E.coli*; линии Е–F – *P.aeruginosa* PA103. Концентрация ОГМГсукц в 1–2 рядах составила 100 мкг/мл; в 3–4 – 50 мкг/мл; в 5–6 – 25 мкг/мл; в 7–8 – 12,5 мкг/мл; в 9–10 – контроль с отсутствием субстанции; в 11–12 – контроль среды с красителем без бактерий. Линии С–F – краситель – ТФТБ (МС быстро окисляется в аэробных условиях, в связи с чем в эксперименте не применялась).

На рис. 5 а показаны нити ложного мицелия, который подвержен деформации. Образец, обработанный ОГМГсукц в концентрации 100 мг/л (рис. 5 б), имеет более ровную клеточную стенку, но есть отдельные частицы неправильной формы (разрушенные). Образец на рис. 5 в содержит группы клеток, однако из-за сканирования в контактном режиме частицы выглядят гладкими хотя на самом деле они имеют шероховатую поверхность. На рис. 5 г обнаружены кластеры того же типа: застрявшие бесформенные клетки с нечёткими краями. Исходя из представленных данных, можно сделать вывод о высокой эффективности ОГМГсукц в отношении данного микроорганизма.

Обсуждение

В связи с перспективой применения и отсутствия подробных экспериментальных доказательств механизма действия ОГМГсукц на живые клетки

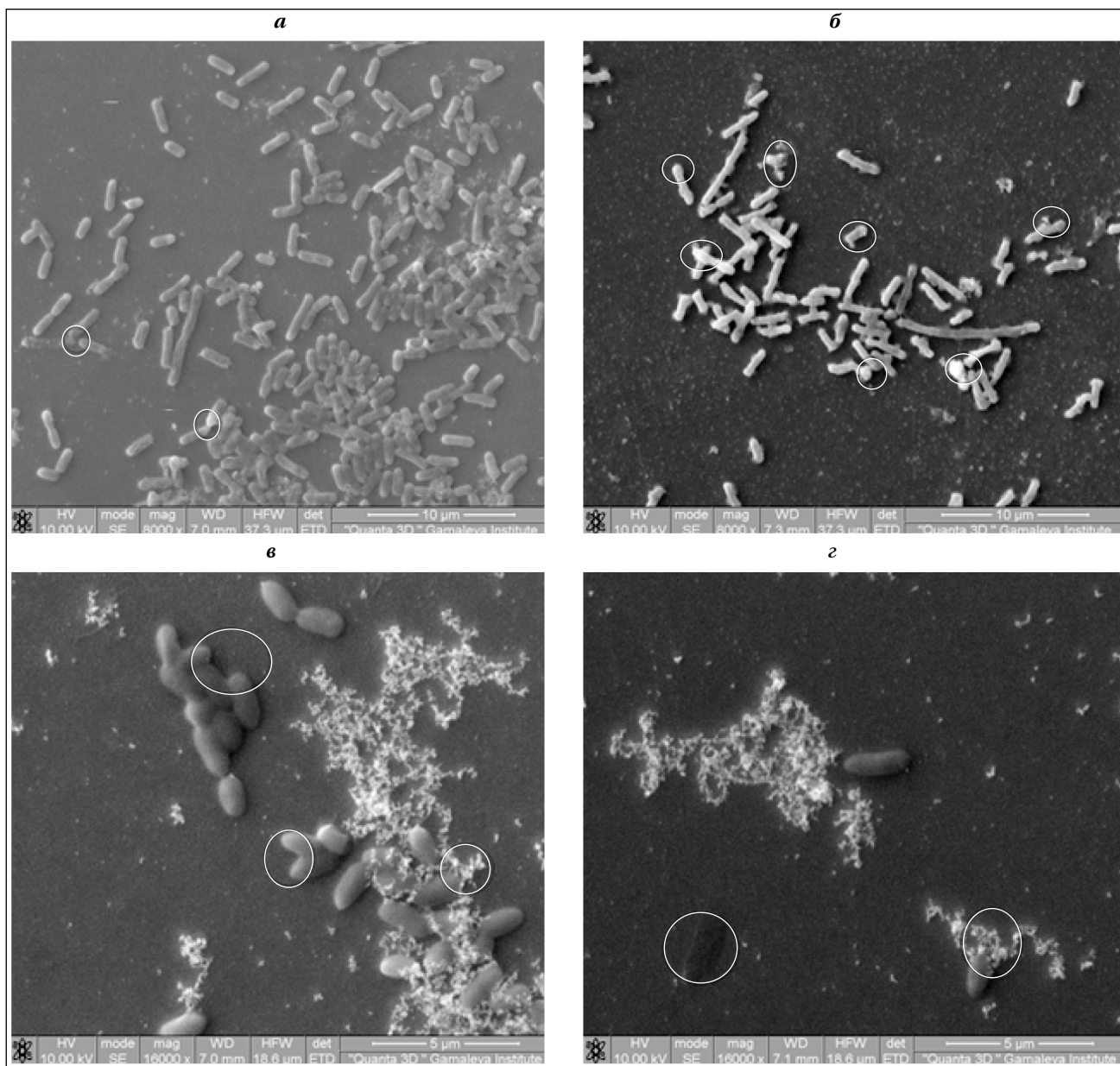


Рис. 3. Результаты сканирующей электронной микроскопии.

а – планктонная культура *E.coli* при воздействии ОГМГсукц в концентрации 8 мкг/мл; *б* – планктонная культура *E.coli* при воздействии ОГМГсукц в концентрации 40 мкг/мл; *в* – биоплёнки *E.coli* при воздействии субингибирующей концентрации ОГМГсукц 2 мкг/мл; *г* – биоплёнки *E.coli* при воздействии МИК ОГМГсукц 8 мкг/мл. Кругом изображены видимые дефекты морфологии клеток.

грамотрицательных бактерий *E.coli* и *P.aeruginosa* были использованы колориметрические методы *in vivo*. Эффективность фармацевтической субстанции ОГМГсукц в отношении микробных дегидрогеназ показана на рис. 2. Проведённые эксперименты доказывают, что фармацевтическая субстанция ОГМГсукц ингибирует метаболизм живых грамотрицательных бактерий, что, в свою очередь, свидетельствует о подавлении реакций восстановления применяемых красителей.

Действие фармацевтической субстанции ОГМГсукц на планктонную культуру и биоплёнку *E.coli* показано на рис. 3. На основании

полученных данных можно сделать вывод, что соединение эффективно против культуры планктона, особенно при концентрации 2 мкг/мл наблюдается более активное образование микроколоний, а МИК для штамма *E.coli* составляет 3 мкг/мл. Согласно результатам отмечено, что ОГМГсукц влияет на образование биоплёнки, однако можно предположить, что этот эффект наблюдается из-за ингибирования роста бактерий. Таким образом, при субингибирующей концентрации ОГМГсукц 2 мкг/мл наблюдается увеличение образования биоплёнки, но при МИК 8 мкг/мл наблюдаются отдельные клетки

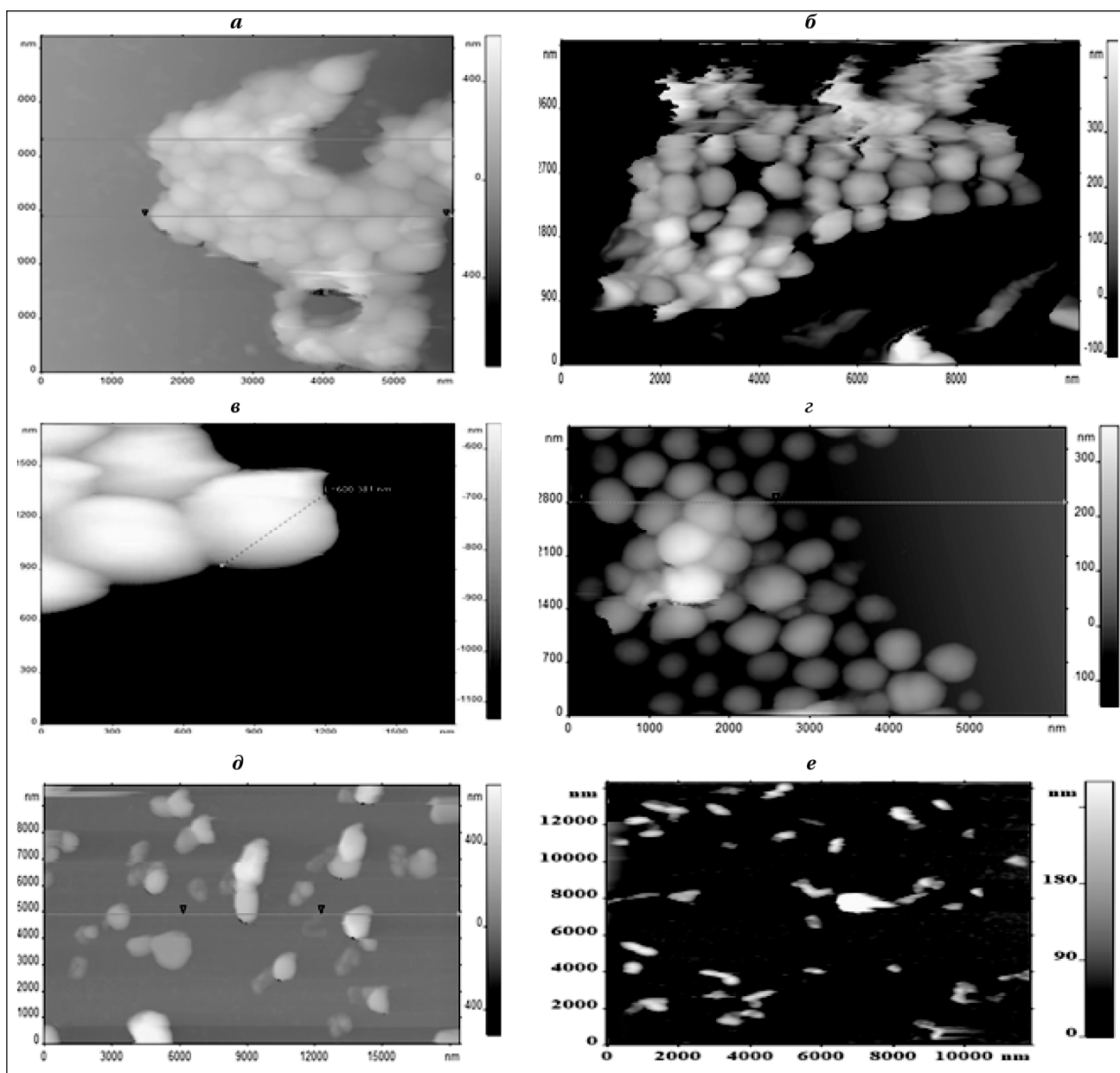


Рис. 4. Результаты АСМ бактерий.

a – обработка культуры *S.epidermidis* R194-18 ОГМГсукц, 40мг/л; *б* – обработка культуры *S.epidermidis* R194-18 ОГМГсукц, 100 мг/л; *в* – обработка культуры *S.aureus* R 116-14 ОГМГсукц в концентрации 40 мг/л; *г* – обработка культуры *S.aureus* R 116-14 ОГМГсукц в концентрации 100 мг/л; *д* – обработка культуры *P.aeruginosa* Z720-17R ОГМГсукц в концентрации 40 мг/л; *е* – обработка культуры *P.aeruginosa* Z720-17R ОГМГсукц в концентрации 100 мг/л.

с нарушенной морфологией. Результаты исследований, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, подтверждают влияние фармацевтического вещества ОГМГсукц на клетки кишечной палочки, которое связано с нарушением целостности бактериальной клеточной стенки.

Разрушающее действие ОГМГсукц на бактериальные клетки с помощью АСМ можно наблюдать и у других микроорганизмов. В частности, на рис. 4 *a, б* влияние ОГМГсукц на структуру бактерий *S.epidermidis* выражается в их стремлении более тесно объединяться в колонии благодаря за-

щитному механизму. На рис. 4 *в, г*, как и в случае с *S.epidermidis*, влияние ОГМГсукц на *S.aureus* выражается в их стремлении к более тесному объединению в колониях, что обеспечивает их выживание. В случае *P.aeruginosa*, напротив, наблюдаются выраженные нарушения сегрегации клеток под влиянием ОГМГсукц (рис. 4 *д, е*).

В образцах, обработанных ОГМГсукц, имеется много отдельных объектов, и чем выше концентрация ОГМГсукц, тем более выражены нарушения сегрегации клеток. Действие ОГМГсукц выражено по отношению к грибам как в случае с *C.albicans* (рис. 5 *a, б*), так и в случае с *A.niger* (рис. 5 *в, г*) в

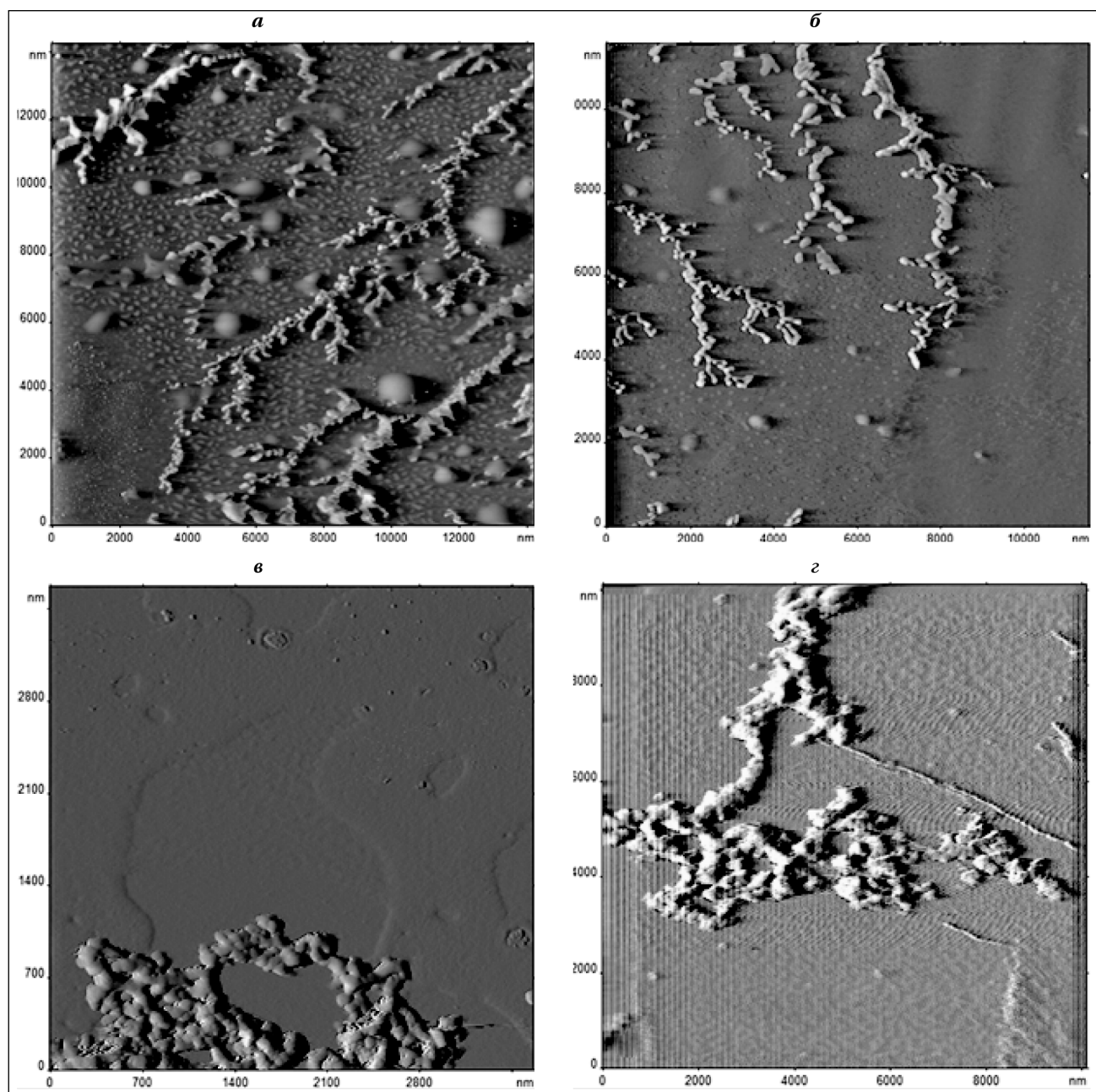


Рис. 5. Результаты АСМ грибов.

а — обработка *C. albicans* G21-0218 ОГМГсукц в концентрации 40 мг/л; *б* — обработка *C. albicans* G21-0218 ОГМГсукц в концентрации 100 мг/л; *в* — обработка *A. niger* F503-18 ОГМГсукц в концентрации 40 мг/л; *г* — обработка *A. niger* F503-18 ОГМГсукц в концентрации 100 мг/л.

пробах много клеток, разрушенных под воздействием исследуемого вещества.

Таким образом, мы можем сделать вывод, что создание антимикробного препарата на основе ОГМГсукц представляет интерес. Изучение влияния ОГМГсукц на бактериальную клеточную стенку, морфологию клеток, а также на способность влиять на микробную биоплёнку позволило понять механизм действия ОГМГсукц, который служит основой для создания фармакологического препарата, активного в отношении конъюнктивита инфекционного характера.

Работа выполнялась в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, департамент Биотехнологии и Промышленной Фармации (БТиПФ).

Выражение признательности. Авторы статьи выражают признательность коллективу НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frost L.S., Boesze-Battaglia K., Mitchell C.H. Autophagy in the eye: implications for ocular cell health. *Experimental Eye Research* 2014; 124: 56–66.
2. Avery R.A., Fisher M.J., Liu G.T. Optic pathway gliomas. *Journal of Neuro-Ophthalmology* 2011; 31: 269–278.
3. Cohen N.R., Lobritz M.A., Collins J.J. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host & Microbe* 2013; 13: 632–642.
4. Campoccia D., Montanaro L., Arciola C.R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 2013; 34: 8533–8554.
5. Jala J.F. Development of antimicrobial surfaces. The first European congress on microbial biofilms: Eurobiofilms 2009, Rome 2–5 September: 98–99.
6. Berlinck R.G.S., Trindade-Silva A.E., Santos M.F.C. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Natural Product Reports* 2012; 29: 1382–1406.
7. Кедик С.А., Шаталов Д.О., Бексаев С.Г., Седишев И.П., Жаворонок Е.С., Сулов В.В., Панов А.В. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси гидрохлорида гуанидина в фармацевтической субстанции «разветвлённый гидрохлорид олигогексаметиленгуанидина». *Вестник МИТХТ*. — 2014. — № 9. — С. 32–36. / Kedik S.A., Shatalov D.O., Beksaev S.G., Sedishhev I.P., Zhavoronok E.S., Suslov V.V., Panov A.V. Razrabotka i validacija metoda kontrolja monomernoj primesi gidrokhlorida guanidina v farmacevticheskoj sub-
8. Воицьева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины — дезинфекционные средства и полифункциональные добавки. М.: ЛКМ-пресс, 2009. — 304 с. / Voinceva I.I., Gembickij P.A. Poliguanidiny — dezinfekcionnye sredstva i polifunkcional'nye dobavki. Moskva: LKM-press, 2009; 304. [in Russian]
9. Broxton P., Woodcock P.M., Gilbert P. A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *J Appl Bacteriol* 1983; 54: 345–353.
10. Ikeda T., Ledwith A., Bamford C.H., Hann R. A. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *BBA — Biomembr* 1984; 769: 57–66.
11. Zhou Z.X., Wei D.F., Guan Y., Zheng A.N., Zhong J.J. Damage of *Escherichia coli* membrane by bactericidal agent polyhexamethylene guanidine hydrochloride: Micrographic evidences. *J Appl Microbiol* 2010; 108: 898–907.
12. Qian L., Xiao H., Zhao G., He B. Synthesis of modified guanidine-based polymers and their antimicrobial activities revealed by AFM and CLSM ACS. *Appl Mater Interfaces* 2011; 3: 1895–1901.
13. Kedik S.A., Sedishev I.P., Panov A.V. Branched oligomers on the basis of a guanidine derivative and disinfecting agent containing said oligomers (alternatives). *WO Patent* 2012/082009, 2012 Jun 21.
14. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY, 1989; 1626.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Иванов Иван Сергеевич — аспирант кафедры Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Шаталов Денис Олегович — к. фарм. н., доцент кафедры Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Кедик Станислав Анатольевич — д. т. н., проф., заведующий кафедрой Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Седишев Игорь Павлович — к. х. н., доцент кафедры Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Грамматикова Наталья Эдуардовна — к. б. н., доцент кафедры Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Айдакова Анна Викторовна — аспирант кафедры Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Трачук Кирилл Николаевич — студент кафедры Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Языкова Екатерина Игоревна — студентка кафедры Биотехнологии и Промышленной Фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

Иммунокорригирующая и противовирусная активность полисахарида из морских бактерий в отношении вируса клещевого энцефалита

*Н. В. КРЫЛОВА, Т. П. СМОЛИНА, М. В. БЕРЛИЗОВА, Г. Н. ЛЕОНОВА

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

Immunocorrective and Antiviral Activity of Polysaccharide from Marine Bacteria Against Tick-Borne Encephalitis Virus

*N. V. KRYLOVA, T. P. SMOLINA, M. V. BERLIZOVA, G. N. LEONOVA

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

Цель работы — изучение иммунокорригирующей и противовирусной активности экстрацеллюлярного полисахарида (ЭПС) из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* в отношении вируса клещевого энцефалита (КЭ). *Материал и методы.* Цитотоксичность ЭПС определяли в культуре клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ) с помощью МТТ-теста. Противовирусную активность ЭПС в отношении вируса КЭ оценивали в культурах клеток СПЭВ и мононуклеарных клеток периферической крови человека с помощью методов ингибирования цитопатогенного действия вируса, непрямой иммунофлуоресценции и ПЦР в реальном времени. Иммунокорригирующую активность ЭПС исследовали в образцах цельной крови (от 10 здоровых доноров), инфицированных вирусом КЭ, методами проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного анализа. *Результаты.* Установлено, что ЭПС нетоксичен, ингибирует репликацию вируса КЭ в клетках СПЭВ и мононуклеарных клетках, значительно снижает количество вирус-инфицированных клеток и уровни вирусной РНК, проявляет выраженные вирулицидные свойства (SI — селективный индекс полисахарида более 40). Внесение ЭПС в образцы цельной крови, инфицированные вирусом КЭ, восстанавливает индуцированное вирусом снижение экспрессии CD69, HLA-DR и CD107a на поверхности моноцитов, NK- и CD8⁺T-клеток и продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IFN- α , TNF- α , IFN- γ , IL-6) иммунокомпетентными клетками. *Заключение.* Полученные результаты позволяют рассматривать экстрацеллюлярный полисахарид из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* в качестве перспективного противовирусного и иммунокорригирующего средства в терапии КЭ.

Ключевые слова: экстрацеллюлярный полисахарид, вирус клещевого энцефалита, противовирусная, иммунокорригирующая активность.

The aim of this study was to examine the immunocorrective and antiviral activity of extracellular polysaccharide (EPS) from the marine bacteria *Pseudoalteromonas nigrifaciens* against tick-borne encephalitis virus (TBEV). *Materials and Methods.* The cytotoxicity of EPS was determined in pig embryo kidney (PK) cells using the MTT test. Antiviral activity of EPS against virus TBEV was evaluated in cell cultures of PK cells and human peripheral blood mononuclear cells using the methods of inhibiting the cytopathogenic effect of the virus, indirect immunofluorescence, and real-time PCR. The immunocorrective activity of EPS was investigated in whole-blood samples (from 10 healthy donors) infected with TBEV, using flow cytometry assay and enzyme immunoassay. *Results.* It was found that EPS is non-toxic, inhibits the TBEV replication in PK cells and mononuclear cells, significantly reduces the number of virus-infected cells and levels of viral RNA, exhibits pronounced virucidal effects (selectivity index of polysaccharide is more than 40). EPS treatment of TBEV-infected whole blood samples restored the virus-induced decline of CD69, HLA-DR and CD107a expression levels on the surface of monocytes, NK and CD8⁺T-cells and the pro-inflammatory cytokine production (IL-1 β , IFN- α , TNF- α , IFN- γ , IL-6) by immunocompetent cells. *Conclusion.* The results obtained allow considering extracellular polysaccharide from marine bacteria *Pseudoalteromonas nigrifaciens* as a promising antiviral and immunocorrective agent against TBE infection.

Keywords: extracellular polysaccharide, tick-borne encephalitis virus, antiviral, immunocorrective activity.

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из самых опасных нейровирусных инфекций во многих странах Евразийского континента. Ежегодно регистрируется около 10 000–15 000 клини-

ческих случаев КЭ, но эти цифры, как полагают, значительно ниже фактических [1]. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) принадлежит к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и имеет три субтипа: дальневосточный, сибирский и европейский [2]. Наиболее эффективным способом предотвращения заболевания КЭ является вакцинация. Лечение пациентов с КЭ, как правило, является симптоматическим и поддерживающим, лицензированных противовирусных препаратов против

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 690087, Владивосток, Сельская, 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова. E-mail: krylovanatalya@gmail.com

ные клетки являлись контролем) и инкубировали в течение 6 сут. при 37°C в CO₂-инкубаторе.

Противовирусную активность ЭПС определяли по разнице титров вируса между обработанными и необработанными инфицированными клетками и выражали в процентах ингибирования (PI). PI рассчитывали по формуле $(PI) = (1 - T/C) \times 100\%$, где T — антилогарифм титра вируса в ЭПС-обработанных клетках, а C — антилогарифм титра вируса в контрольных клетках [20]. Ингибирующую концентрацию (IC₅₀) определяли как концентрацию ЭПС, которая снижала индуцированный вирусом ЦПД на 50%. Индекс селективности (SI) рассчитывали как отношение CC_{50} к IC₅₀.

Моделирование ВКЭ-инфекции *ex vivo*. Образцы цельной крови (12 мл) были собраны с гепарином от здоровых доноров ($n=10$), не болевших КЭ и не вакцинированных против КЭ. Средний возраст доноров составил 32 года (от 28 до 37 лет). Все доноры дали письменное информированное согласие на участие в исследовании, и протокол исследования был одобрен Комитетом по этике НИИ ЭМ им. Сомова (протокол №2 от 12 февраля 2017 г.). Каждый образец цельной крови (~4×10⁶ клеток/мл) был разделён на три равные порции для анализа: 1) ВКЭ-инфекции в моноклеарных клетках периферической крови человека (МНК); 2) экспрессии поверхностных антигенов на клетках крови (FACS анализ); 3) продукции цитокинов этими клетками.

Моноклеарные клетки были выделены из образцов цельной крови после центрифугирования (400 г, 30 мин) с использованием градиента плотности фиколл-верографина (Pan-Eco, Россия). Клетки дважды промывали и ресуспендировали в среде 199, содержащей гентамицин, с последующим разбавлением клеточной суспензии до конечной концентрации 4×10⁶ клеток/мл. Жизнеспособность выделенных МНК, которую оценивали по окрашиванию трипановым синим, составила > 97%.

Для оценки продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками образцы цельной крови разводили 1:2 в среде RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия), содержащей L-глутамин и гентамицин.

Каждая порция как цельной крови, так и МНК, была разделена на четыре аликвоты по 1 мл. Первую группу аликвот инфицировали вирусом КЭ в дозе 100 ТЦД₅₀/мл и обозначали как ВКЭ-образцы (вирус-инфицированные и необработанные). Вторую группу аликвот одновременно инфицировали 100 ТЦД₅₀/мл ВКЭ и обрабатывали 100 мкг/мл ЭПС и обозначали как ВКЭ+ЭПС образцы (вирус-инфицированные и ЭПС-обработанные). Третью группу аликвот обрабатывали 100 мкг/мл ЭПС и обозначали как ЭПС-образцы (обработанные ЭПС). Четвёртая группа необработанных и неинфицированных аликвот использовалась в качестве контроля. Все аликвоты инкубировали в течение 24 ч при 37°C. После инкубации жизнеспособность МНК при окрашивании трипановым синим составила > 95%.

Исследование ВКЭ-инфекции в моноклеарных клетках периферической крови человека. Аликвоты с МНК, инфицированные (обработанные ЭПС и необработанные) вирусом КЭ, через 24 ч после инфицирования (п. и.) центрифугировали (500 г, 10 мин), промывали и ресуспендировали и в каждом образце определяли процент вирус-инфицированных клеток, титр вируса и присутствие вирусной РНК.

Процент МНК, инфицированных ВКЭ, определяли методом непрямой иммунофлуоресценции. Моноклеарные клетки помещали на покровные стёкла, фиксировали охлаждённым ацетоном. На клетки наносили человеческую сыворотку, содержащую антитела к ВКЭ (разведение 1:40), и антивидовые иммуноглобулины против иммуноглобулинов человека, меченые FITC (разведение 1:64; Медгамал, Россия), и визуализировали в люминесцентном микроскопе (Micros 200A, Австрия). В каждом образце, по меньшей мере, в пяти полях (100–120 клеток на поле) были подсчитаны соотношения (%) инфицированных вирусом клеток (окрашенных) к об-

щему количеству клеток. Флуоресцентные изображения МНК (ВКЭ+ЭПС-образцы, ВКЭ-образцы и контроли) получали на лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного объектива 40X.

Количество вируса, связанного с МНК, определяли с помощью титрования образцов на клетках СПЭВ. Каждую аликвоту дважды замораживали/оттаивали и центрифугировали (500 г, 10 мин). Супернатанты серийно разводили (от 10⁻¹ до 10⁻⁸), и каждое разведение наносили на монослой клеток СПЭВ, выращенных в 96-луночных планшетах. После 1 ч адсорбции при 37°C клетки промывали и инкубировали с поддерживающей средой в течение 6 сут. при 37°C в CO₂-инкубаторе. Титры вируса выражали в виде ТЦД₅₀/мл.

Анализ полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) проводился для выявления РНК ВКЭ в образцах инфицированных моноклеарных клеток. Выделение суммарной РНК вируса из клеток проводили с использованием набора реагентов для экстракции нуклеиновых кислот «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентной детекцией осуществляли с использованием набора «AmpliSens® TBE-FL» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), содержащего олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие фрагмент гена структурного белка Е вируса КЭ. Амплификацию проводили в объёме 25 мкл реакционной смеси в следующих условиях: 1 цикл при 50°C — 30 мин; 1 цикл при 95°C — 15 мин; 5 циклов при 95°C — 10 с, 65°C — 45 с и 72°C — 15 с; затем 45 циклов при 95°C — 10 с и 60°C — 45 с. РНК вируса КЭ детектировали по каналу флуоресценции FAM/Green (470 нм/510 нм) с использованием «Rotor-Gene Q» (QIAGEN Hilden, Германия). Данные ПЦР-РВ анализировали с помощью метода определения порогового цикла реакции (Ct), где значение Ct менее 37 циклов считается положительным.

Проточная цитометрия (FACS-анализ). Экспрессию мембранных молекул (CD69, HLA-DR и CD107a) на иммунокомпетентных клетках человека оценивали в образцах цельной крови через 24 ч п.и. с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания моноклональными антителами (МКА). В настоящем исследовании использовались следующие МКА с соответствующими изотипическими контролями: анти-CD3-FITC, анти-CD3-PC5, анти-CD14-FITC, анти-CD69-PE, анти-CD8-FITC, анти-HLA-DR- PE, анти-CD56-APC, анти-CD107a-PE (Beckman Coulter, США).

Образцы цельной крови инкубировали с МКА в течение 30 мин при комнатной температуре. Эритроциты лизировали FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, США) в течение 15 мин при комнатной температуре, клетки промывали и ресуспендировали в PBS (Cell Wash, Becton Dickinson). Окрашенные клетки (минимум 10000 клеток/образец) анализировали с использованием проточного цитофлуориметра FACSCalibur (США) и программного обеспечения CellQuest Pro (Becton Dickinson, США). Результаты анализа экспрессии CD69, HLA-DR, CD107a представлены как средний процент иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих соответствующие молекулы клеточной поверхности.

Анализ продукции цитокинов методом ИФА. Уровни цитокинов (IL-1β, IFN-α, TNF-α, IFN-γ, IL-6) в супернатантах образцов цельной крови оценивали через 24 ч п.и. с помощью коммерческих ИФА-наборов («Цитокин», Санкт-Петербург, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Все тесты проводились в двух повторах, а оптическая плотность (OD) измерялась при 450 нм. Концентрации цитокинов рассчитывали по значениям OD с использованием стандартной кривой для каждого анализируемого цитокина. Минимальные определяемые концентрации составляли 6,3 пкг/мл для IL-1β; 5,0 пкг/мл для IFN-α; 1,0 пкг/мл для TNF-α; 20 пкг/мл для IFN-γ и 5,0 пкг/мл для IL-6.

Статистический анализ. Значения CC_{50} и IC₅₀ были рассчитаны с помощью регрессионного анализа кривой доза-ответ. Результаты выражены как среднее значение ± стандарт-

ное отклонение. Данные были проанализированы с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим специальным тестом Бонферрони. Расчёты проводились с использованием Statistica 10. Значения $p \leq 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты

Цитотоксичность и противовирусная активность ЭПС. Анализ цитотоксичности проводили для определения нетоксичного для клеток СПЭВ диапазона концентраций тестируемого полисахарида и последующего изучения его активности в отношении вируса КЭ. На основании результатов МТТ-анализа была получена кривая доза—ответ для ЭПС (рис. 1, а), рассчитана 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}) и определена максимальная нецитотоксическая концентрация (MNTC), при которой более 90% клеток СПЭВ были жизнеспособны. Значение CC_{50} составило $10\,900 \pm 350$ мкг/мл, MNTC — 1000 ± 30 мкг/мл ЭПС. Дальнейший анализ противовирусной активности проводили при концентрациях ниже 1000 мкг/мл.

Для изучения механизма вирусингибирующего действия ЭПС было исследовано влияние различных концентраций тестируемого полисахарида (от 15 до 1000 мкг/мл) на некоторые стадии жизненного цикла ВКЭ. Клетки были предварительно обработаны ЭПС перед вирусной инфекцией (предварительная обработка клеток), вирус инкубировали с ЭПС перед инфицированием клеток (предварительная обработка вируса) и инфицированные клетки инкубировали с ЭПС (обработка инфицированных клеток) (рис. 1, б, в).

Установлено, что наиболее высокая активность ЭПС в отношении ВКЭ наблюдалась при прямом воздействии полисахарида на вирусные частицы. Так, предварительная обработка вируса максимальной нецитотоксической концентрацией ЭПС (1000 мкг/мл) вызвала снижение титра вируса на $5,3 \pm 0,5 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл по сравнению с необработанными контролями, процент ингибирования вирус-индуцированного ЦПД составил $67,9 \pm 5\%$ (рис. 1, б, в). При этом значение IC_{50} составило $244,4 \pm 10,2$ мкг/мл при SI $44,6 \pm 0,8$. В то же время предварительная обработка клеток полисахаридом показала умеренную противовирусную активность (IC_{50} — $1071,2 \pm 20,5$; SI — $10,2 \pm 1,1$), а использование 1000 мкг/мл ЭПС привело к снижению титров вируса КЭ на $3,7 \pm 0,4 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл (рис. 1, б). Между тем, добавление тестируемого полисахарида после проникновения вируса в клетки (обработка инфицированных клеток) слабо защищало клетки от ВКЭ-индуцированного ЦПД.

Оценка способности ЭПС влиять на ранние стадии ВКЭ инфекции (первые 24 ч) была выполнена в экспериментах *ex vivo* с использованием образцов цельной крови и мононуклеарных клеток периферической крови от здоровых доноров. Эти эксперименты были проведены с использованием

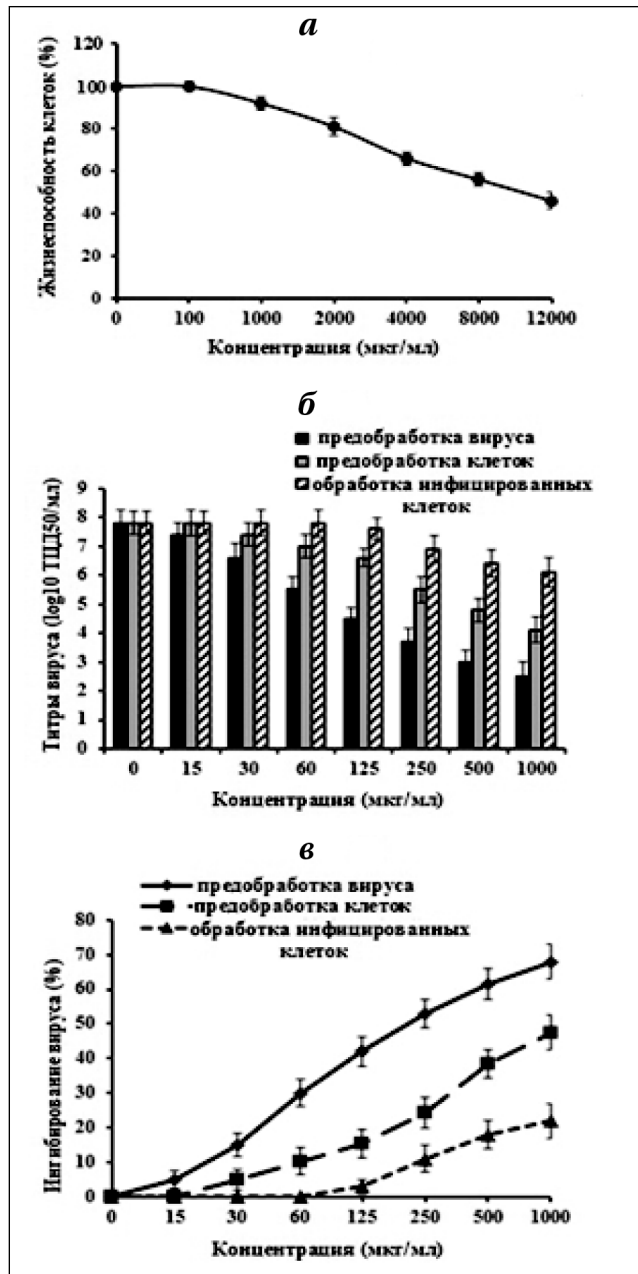


Рис. 1. Цитотоксичность и противовирусная активность ЭПС в отношении вируса КЭ в культуре клеток СПЭВ.

а — цитотоксичность ЭПС; б, в — противовирусная активность ЭПС при разных схемах его применения через 6 сут. п.и.; б — противовирусная активность ЭПС оценивалась по снижению титров вируса в ЭПС-обработанных и необработанных инфицированных клетках; в — противовирусная активность ЭПС представлена в процентах ингибирования цитопатогенного действия вируса в ЭПС-обработанных и необработанных инфицированных клетках.

100 мкг/мл ЭПС и 100 ТЦД₅₀/мл вируса КЭ. Выбор концентрации полисахарида и инфицирующей дозы вируса был ранее определён в исследованиях, оценивающих влияние как ЭПС [21], так и вируса КЭ [22] на иммунокомпетентные клетки в образцах цельной крови здоровых доноров.

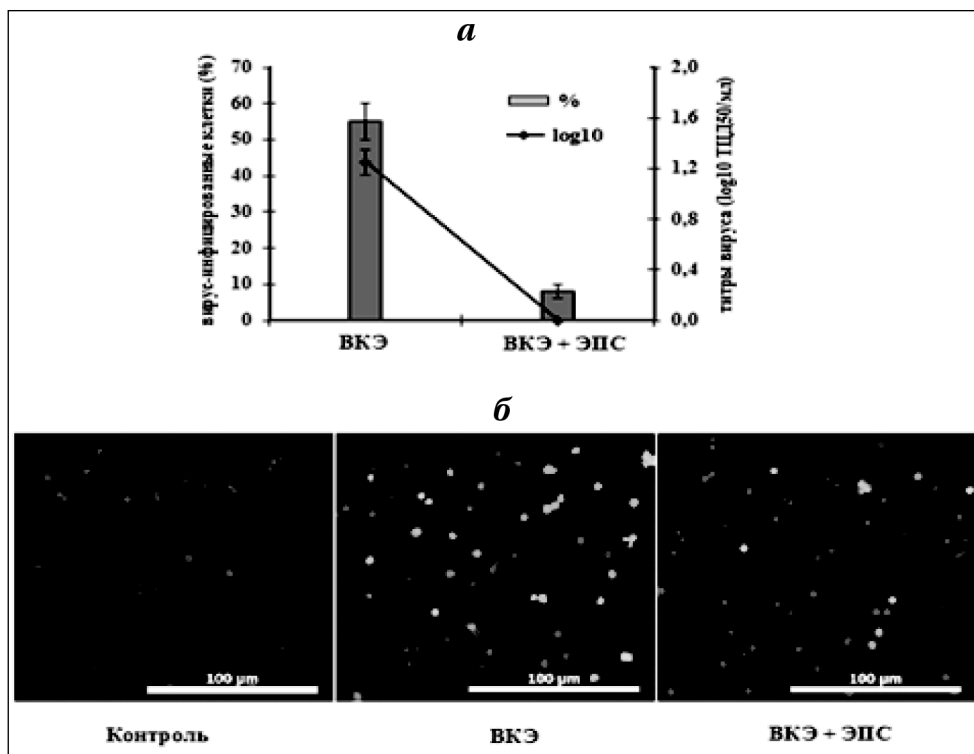


Рис. 2. Влияние ЭПС на вирус-инфицированные мононуклеарные клетки человека через 24 ч п.и.

а — количество вирус-инфицированных МНК (%; столбцы); количество вируса, связанного с МНК (титр вируса в log₁₀ ТЦД₅₀/мл, линия); *б* — флуоресцентные изображения МНК, полученные с помощью лазерного сканирующего микроскопа, иммерсионный объектив 40×.

Влияние ЭПС на ВКЭ инфекцию мононуклеарных клеток периферической крови. Способность ЭПС влиять на ранние стадии ВКЭ инфекции в МНК оценивали по количеству вирус-инфицированных клеток, инфекционным титрам вируса и выявлению вирусной РНК. Через 24 ч п. и. процент вирус-инфицированных клеток в инфицированных необработанных МНК (ВКЭ-образцы) составлял 55±5%, титры вируса были 1,25±0,2 log₁₀ ТЦД₅₀/мл (рис. 2, *а, б*). В то же время в инфицированных и одновременно обработанных ЭПС мононуклеарных клетках (ВКЭ+ЭПС-образцы) среднее значение вирус-инфицированных клеток достигало только 8±2%, и инфекционный вирус (в титрах) не был обнаружен (рис. 2, *а, б*). ПЦР-РВ через 24 ч п. и. подтвердила присутствие вирусной РНК в ВКЭ-образцах МНК (значение C_t = 33,7±0,9), в то время как в ВКЭ+ЭПС-образцах вирусная РНК не была обнаружена (значение C_t > 37).

Экспрессия CD69, HLA-DR и CD107a на поверхности иммунокомпетентных клеток в образцах цельной крови. Активацию и цитотоксический потенциал иммунокомпетентных клеток (моноцитов, NK- и CD8⁺T-клеток) оценивали в образцах цельной крови доноров. Следует отметить, что использование цельной крови позволяет сохранить существующий *in vivo* баланс различных типов

клеток крови и наиболее близко отражает процессы, которые происходят *in vivo*.

Экспрессия CD69 и HLA-DR на моноцитах (рис. 3). CD69 является одним из ранних активационных антигенов, который экспрессируется на поверхности моноцитов, NK-клеток и лимфоцитов, хотя динамика экспрессии CD69 зависит от типа клеток и методов стимуляции [23]. Мы обнаружили, что через 24 ч п. и. уровни экспрессии CD69 на моноцитах в инфицированных образцах (ВКЭ-образцы) были ниже по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$) (рис. 3, *б*). Обработка образцов крови исследуемым полисахаридом (ЭПС-образцы и ВКЭ+ЭПС-образ-

цы) значительно повышала уровень экспрессии этого активационного антигена по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Но процент моноцитов, экспрессирующих CD69, был выше в ЭПС-образцах (45,5±6,6%), чем таковой в ВКЭ+ЭПС-образцах (29,5±4,5%) ($p \leq 0,05$).

HLA-DR относится к молекулам главного комплекса гистосовместимости класса II, которые необходимы для процессинга антигена и презентации Т-клеткам, и конститутивно экспрессируются на поверхности моноцитов у здорового человека [24].

При исследовании экспрессии HLA-DR на моноцитах в образцах цельной крови доноров через 24 ч п. и. были обнаружены высокие уровни экспрессии этого антигена в контрольных образцах, ЭПС- и ВПЭ+ЭПС-образцах (рис. 3, *в*). В ВКЭ-образцах процент моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, был значительно ниже по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Экспрессия CD69 и CD107a на NK- и CD8⁺T-клетках (рис. 4). Изменения экспрессии CD69 на поверхности NK-клеток в образцах цельной крови через 24 ч п. и. были сходны с таковыми на моноцитах: процент NK-клеток, экспрессирующих CD69, был значительно ниже в В-образцах, в то время как в ЭПС- и ВКЭ+ЭПС-образцах этот

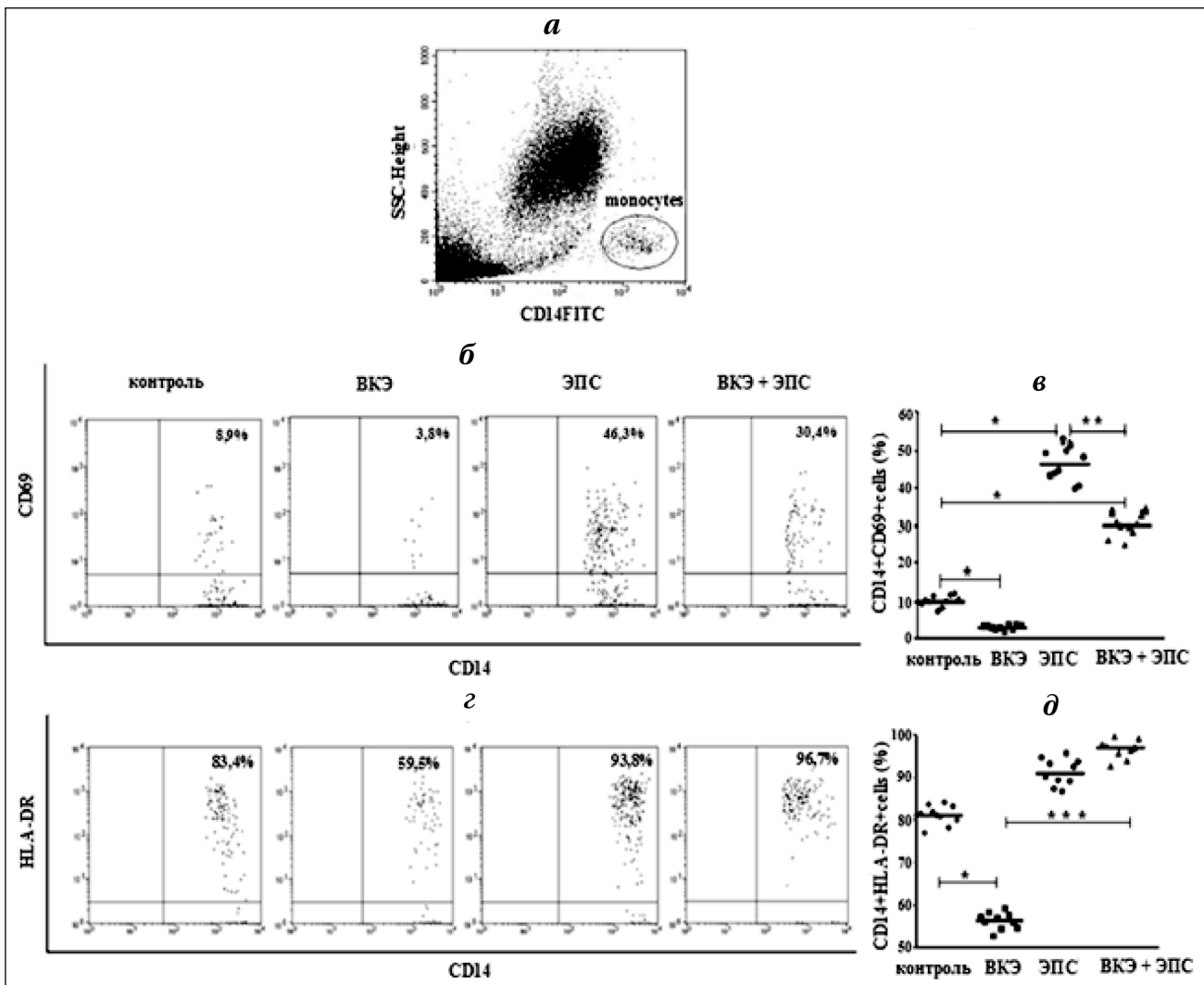


Рис. 3. Влияние ЭПС и вируса КЭ на экспрессию CD69 и HLA-DR моноцитами донорской крови через 24 ч п. и. а – стратегия гейтирования моноцитов. Верхняя панель показывает экспрессию CD69 на моноцитах: б – одного образца крови из 10 исследованных; в – всех 10 образцов крови. Нижняя панель показывает экспрессию HLA-DR на моноцитах: г – одного образца крови из 10 исследованных; д – всех 10 образцов крови. * – различия значимы по отношению к показателям контрольных образцов ($p \leq 0,05$); ** – значимы при сравнении показателей ЭПС-образцов и ВКЭ+ЭПС-образцов ($p \leq 0,05$); *** – различия значимы при сравнении показателей ВКЭ-образцов и ВКЭ+ЭПС-образцов ($p \leq 0,05$).

процент был значительно выше по сравнению с контролями ($p \leq 0,05$). В тоже время отмечались более высокие уровни экспрессии CD69 на NK-клетках в ЭПС-образцах ($70,7 \pm 4,8\%$), чем в ВКЭ+ЭПС-образцах ($43,1 \pm 3,8\%$) ($p \leq 0,05$).

CD107a, связанный с лизосомами мембранный белок-1 (LAMP-1), является маркером деградации NK-клеток, активированных CD8⁺T-клеток и других типов клеток, и уровни экспрессии CD107a положительно коррелируют с цитотоксической активностью этих клеток [25, 26]. Мы наблюдали низкие уровни экспрессии CD107a ($1,1\text{--}2,5\%$) на NK-клетках в контрольных и ВКЭ-образцах цельной крови через 24 ч п. и. (см. рис. 4). Между тем процент NK-клеток, экспрессирующих CD107a, был выше в ЭПС-образ-

цах ($10,2 \pm 1,7\%$) и ВКЭ+ЭПС-образцах ($7,0 \pm 1,5\%$) по сравнению с контролями ($p \leq 0,05$).

Процент CD8⁺T-клеток, экспрессирующих CD69 и CD107a в образцах цельной крови через 24 ч п. и., был невысок. Уровни экспрессии этих молекул в контрольных и ВКЭ-образцах отличались незначительно, но в ЭПС- и ВКЭ+ЭПС-образцах экспрессия CD69 и CD107a была выше по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). При этом количество CD8⁺T-клеток, экспрессирующих CD69 в ВКЭ+ЭПС-образцах, было ниже ($11,4 \pm 1,5\%$), чем в ЭПС-образцах ($19,1 \pm 2,6\%$) ($p \leq 0,05$) (см. рис. 4).

Влияние ЭПС и ВКЭ на продукцию цитокинов клетками цельной крови. Воздействие тестируемого полисахарида и вируса КЭ на продукцию различных провоспалительных цитокинов (IFN- α , IL-1 β ,

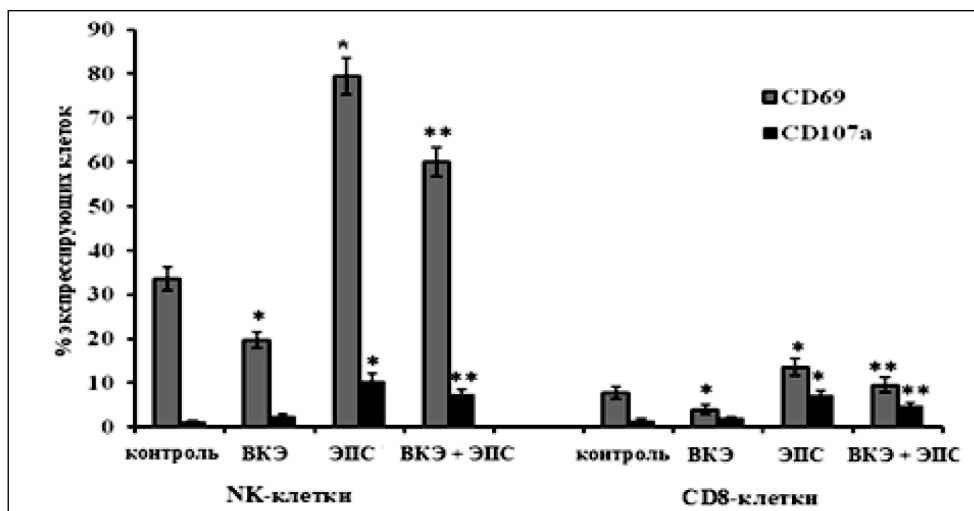


Рис. 4. Влияние ЭПС на вирус-инфицированные мононуклеарные клетки человека через 24 ч п.и.

а — количество вирус-инфицированных МНК (%; столбцы); количество вируса, связанного с МНК (титр вируса в $\log_{10}$ ТЦД₅₀/мл, линия); *б* — флуоресцентные изображения МНК, полученные с помощью лазерного сканирующего микроскопа, иммерсионный объектив 40X.

TNF- α , IFN- γ и IL-6) исследовали в образцах цельной крови через 24 ч п. и. (таблица). Высокие уровни всех анализируемых цитокинов были обнаружены в супернатантах ЭПС-образцов (неинфицированных ВКЭ). Напротив, инфицирование образцов цельной крови вирусом КЭ (ВКЭ-образцы) не индуцировало значимую продукцию цитокинов IFN- α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и IL-6. В то же время обработка ЭПС и одновременное инфицирование вирусом образцов цельной крови (ВКЭ+ЭПС) приводило к значительному увеличению продукции цитокинов по сравнению с таковым в ВКЭ-образцах ($p \leq 0,05$). Однако концентрации цитокинов IFN- α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и IL-6 в супернатантах ВКЭ+ЭПС-образцов были ниже, чем таковые в ЭПС-образцах ($p \leq 0,05$).

Обсуждение

Известно, что все флавивирuses, включая ВКЭ, выработали различные стратегии модуляции иммунного ответа хозяина для эффективной инфекции и репликации [4, 27]. В этой связи, остаётся актуальным поиск препаратов, способных ингибировать репликацию вируса и элиминировать его из организма, а также корректировать ин-

дуцированную вирусом иммуносупрессию. Это побудило нас исследовать противовирусную активность экстрацеллюлярного полисахарида, выделенного из морской бактерии *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, который, как было показано ранее [21], активировал NK-клетки, CD8⁺T-лимфоциты и моноциты. Эти иммунокомпетентные клетки играют важную роль в иммунной защите от многих вирусных инфекций, включая ВКЭ, благодаря своей цитотоксической активности и продукции провоспалительных цитокинов [28].

В настоящей работе мы исследовали активность ЭПС в отношении вируса КЭ и цитотоксичность этого полисахарида для клеток СПЭВ, высокочувствительных к ВКЭ инфекции. Установлено, что ЭПС практически нетоксичен для этих клеток (CC_{50} =10900 мкг/мл, рис. 1, *а*). При различных способах воздействия ЭПС на вирус КЭ и клетки СПЭВ полисахарид снижал титры вируса в зависимости от концентрации препарата (см. рис. 1, *б*, *в*). Предварительная обработка вируса ЭПС показала наиболее эффективную противовирусную активность, приводящую к значительному ингибированию вирус-индуцированного ЦПД через 6 сут п. и. (SI — 44,6). Умеренное снижение репликации вируса ТВЕ наблюдалось при предварительной обработке клеток СПЭВ полисахаридом (SI — 10,2). Таким образом, результаты, полученные при воздействии ЭПС на разные стадии репликации вируса, позволяют предположить, что ингибирующий эффект ЭПС может быть обусловлен его способностью непосредственно инактивировать вирусные частицы, а также предотвращать адсорбцию вируса на

Уровни цитокинов в супернатантах образцов цельной крови через 24 ч после обработки

Цитокины (пкг/мл)	Обработка образцов			
	Контроль	ВКЭ	ЭПС	ВКЭ+ЭПС
IFN- α	10,3 $\pm$ 2,7	<5,0	52,7 $\pm$ 5,4*	21,8 $\pm$ 3,9**
IL-1 β	11,7 $\pm$ 2,4	$\leq$ 6,3	501,9 $\pm$ 24,1*	343,3 $\pm$ 18,7**
TNF- α	3,2 $\pm$ 0,7	$\leq$ 1,1	216,1 $\pm$ 12,1*	112,2 $\pm$ 11,3**
IFN- γ	28,1 $\pm$ 3,2	$\leq$ 20,0	87,5 $\pm$ 7,9*	42,3 $\pm$ 6,7**
IL-6	8,4 $\pm$ 1,5	$\leq$ 5,0	402,9 $\pm$ 12,8*	292,5 $\pm$ 13,4**

Примечание. * — различия значимы по отношению к показателям контрольных образцов ($p \leq 0,05$); ** — различия значимы при сравнении показателей ЭПС-образцов и ВКЭ+ЭПС-образцов ($p \leq 0,05$).

клетки. Сообщалось, что некоторые ЭПС, продуцируемые морскими бактериями, имеют аналогичные механизмы действия против таких вирусов, как HSV-1, HSV-2, HCV [29, 30].

Кроме того, мы исследовали, способен ли тестируемый полисахарид индуцировать вирусингибирующее действие на ранней стадии ВКЭ инфекции в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК), выделенных из крови здоровых доноров. Полученные нами результаты подтвердили предыдущие данные [22] о том, что штамм Дальнегорск вируса КЭ быстро проникает и эффективно размножается в МНК (ВКЭ-образцы) в течение 24 ч п. и. (см. рис. 2). Между тем, обработка ЭПС инфицированных МНК (ВКЭ+ЭПС-образцы) значительно снижала количество вирус-инфицированных клеток, приводила к низким титрам вируса и необнаруживаемым уровням вирусной РНК. Эти данные согласуются с результатами ЭПС-обработки инфицированных вирусом КЭ клеток СПЭВ и указывают на способность тестируемого полисахарида защищать МНК от вирус-индуцированного ЦПД на ранней стадии инфекции. Мы предполагаем, что одним из возможных механизмов противовирусного действия, когда МНК одновременно инфицированы вирусом КЭ и обработаны ЭПС, является способность ЭПС связывать и/или инактивировать вирусные частицы, тем самым предотвращая прикрепление, проникновение и репликацию вируса.

Затем мы исследовали влияние ЭПС на иммунокомпетентные клетки в образцах цельной крови, инфицированных ВКЭ. Так, через 24 ч п. и. в образцах крови, инфицированных, но необработанных ЭПС (ВКЭ-образцы), отмечалось снижение уровней экспрессии маркёров ранней и поздней активации (CD69 и HLA-DR) на поверхности моноцитов (см. рис. 3) и значительное уменьшение количества НК-клеток, экспрессирующих CD69 (см. рис. 4). В этих образцах цитотоксические лимфоциты (НК и CD8⁺T-клетки) экспрессировали незначительные уровни маркёра дегрануляции CD107a (см. рис. 4), экспозиция которого на поверхности коррелирует с опосредованной гранзимом и перфорином цитотоксической активностью этих клеток [25, 26]. Кроме того, супернатанты ВКЭ-образцов содержали незначительные количества IFN- α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6 (см. таблицу), которые являются важными компонентами раннего иммунного ответа на вирусные инфекции. Таким образом, способность вируса ВКЭ на ранней стадии инфицирования клеток крови индуцировать снижение активации и цитотоксического потенциала иммунокомпетентных клеток и подавление продукции провоспалительных цитокинов может быть одной из стратегий, выработанных ВКЭ для избега-

ния иммунных реакций хозяина. Это способствует эффективной репликации вируса в клетках, как показано на рис. 2. Рядом авторов установлено, что некоторые флавивирuses (DENV, WNV и TBEV) способны задерживать индукцию IFN- α на ранней стадии инфекции (первые 24 ч). Эта задержка необходима вирусам для создания из цитоплазматических мембран клетки «компартов репликации», в которых вирусная РНК защищена от иммунного распознавания до тех пор, пока не будет достаточного количества вирусного потомства [3, 31, 32].

Мы показали, что обработка ЭПС образцов крови, инфицированных ВКЭ (ВКЭ+ЭПС), приводит к значительному увеличению экспрессии мембранных молекул на моноцитах, НК и CD8-клетках, и повышению продукции цитокинов (IFN- α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6) по сравнению с ВКЭ-образцами. Известно, что эффективная элиминация вируса зависит от способности хозяина развивать иммунный ответ Th1-типа, характеризующийся активацией моноцитов/макрофагов, НК-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов и продукцией провоспалительных цитокинов [11, 33]. Вероятно противовирусный эффект ЭПС (см. рис. 1, 2) может быть опосредованно связан с его способностью индуцировать Th1-тип клеточный иммунитет на ранней стадии ВКЭ-инфекции посредством активации иммунокомпетентных клеток, увеличения их цитотоксичности и повышения продукции Th1-цитокинов. Поскольку исследование проводилось на образцах донорской цельной крови, существует вероятность того, что другие факторы могут способствовать процессу ингибирования ВКЭ-инфекции тестируемым полисахаридом. Необходимы дальнейшие исследования для более точного определения механизма противовирусного действия ЭПС.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали противовирусную активность и иммунокорригирующее действие экстрацеллюлярного полисахарида из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*. ЭПС ингибирует репликацию вируса КЭ в клетках СПЭВ и мононуклеарных клетках периферической крови человека, инактивирует вирусные частицы и предотвращает адсорбцию вируса на эти клетки. Обработка ЭПС ВКЭ-инфицированных клеток крови может восстанавливать вызванные вирусом нарушения функциональной активности иммунокомпетентных клеток на ранней стадии инфекции. Взяты вместе наши результаты различных аспектов активности ЭПС позволяют нам рассматривать этот полисахарид как потенциальное противовирусное и иммунокорригирующее средство в отношении ВКЭ и, возможно, других флавивирусных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bogovic P., Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* 2015; 3: 430–441.
2. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego; 2012.
3. Robertson S.J., Lubick K.J., Freedman B.A., Carmody A.B., Best S.M. Tick-Borne Flaviviruses Antagonize Both IRF-1 and Type I IFN Signaling To Inhibit Dendritic Cell Function. *J Immunology* 2014; 192: 2744–2755.
4. Ye J., Zhu B., Fu Z.F., Chen H., Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine* 2013; 31: 461–471.
5. 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: 69–103.
6. Parkar D., Jadhav R., Pimpliskar M. Marine bacterial extracellular polysaccharides: A review. *JCLM* 2017; 5: 29–35.
7. Holmstrom C., Kjelleberg S. Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* 1999; 30: 285–293.
8. Dheilly A., Soum-Soutera E., Klein G.L., Bazire A., Compere C., Haras D. et al. Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Applied Environ Microbiol* 2010; 76: 3452–3461.
9. Sivasubramanian K., Ravichandran S., Vijayapriya M. Antagonistic activity of marine bacteria *Pseudoalteromonas tunicata* against microbial pathogens. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5: 562–567.
10. Yu M., Wang J., Tang K., Shi X., Wang S., Zhu W.M. et al. Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. *Microbiology* 2012; 158: 835–842.
11. Gugliandolo C., Spano A., Maugeri T., Poli A., Arena A., Nicolaus B. Role of Bacterial Exopolysaccharides as Agents in Counteracting Immune Disorders Induced by Herpes Virus. *Microorganisms* 2015; 3: 464–483.
12. Yu L., Sun G., Wei J., Wang Y., Du C., Li J. Activation of macrophages by an exopolysaccharide isolated from Antarctic *Psychrobacter* sp. B-3. *Chin J Ocean Limnol* 2016; 34: 1064–1071.
13. Chen G., Qiana W., Lia J., Xua Y., Chena K. Exopolysaccharide of Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. S-5 induces apoptosis in K562 cells. *Carbohydr Polym* 2015; 121: 107–114.
14. Al-Nahas M.O., Darwish M.M., Ali A.E., Amin M.A. Characterization of an exopolysaccharide-producing marine bacterium, isolate *Pseudoalteromonas* sp. AM Afr J Microbiol Res 2011; 5: 3823–3831.
15. Ghada S.I., Manal G.M., Mohsen M.S.A., Eman A.G. Production and Biological Evaluation of Exopolysaccharide from Isolated *Rhodotorula glutinis*. *Aust J Basic & Appl Sci* 2012; 6: 401–408.
16. Osama H.E.S., Abd El Kader M.E.S., Hassan M.S., Manal G.M., Mohsen S.A., Saher S.M. Isolation, characterization and biological activities of exopolysaccharide produced by *Bacillus marinus*. *Der Pharma Chemica* 2015; 7: 200–208.
17. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Зубков В.А., Иванова Е.П., Оводов Ю.С., Шапков А.С. и соавт. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonas haloplanktis* KMM 156. Биоорганическая химия. — 1993. — № 19. — С. 327–336. / Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov V.A., Ivanova E.P., Ovodov Jy.S., Shashkov A.S. i soavt. Struktura povtoryajushchegosya zvena kislogo polisakharida *Alteromonas haloplanktis* KMM 156. *Bioorgan khimiya* 1993; 19: 327–336. [in Russian]
18. Leonova G.N., Maystrovskaya O.S., Kondratov I.G., Takashima I., Belikov S.I. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection. *Virus Res* 2014; 189: 34–42.
19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63.
20. Koseki I., Simoni I.C., Nakamura I.T., Noronha A.B., Costa S.S. Antiviral activity of plant extracts against aphthovirus, pseudorabies virus and pestivirus in cell cultures. *Microbios Letters* 1990; 44: 19–30.
21. Смолина Т.П., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Изменение уровня экспрессии молекул адгезии клеток врожденного иммунитета человека гликополимерами морских бактерий. Антибиотики и химиотер. — 2015. — Т. 60. — № 5–6. С. 3–7. / Smolina T.P., Zaporozhets T.S., Besednova N.N. Izmenenie urovnya ekspressii molekul adgezii kletok vrozhdennogo immuniteta cheloveka glikopolimerami morskikh bakterij. *Antibiotiki i khimioter* 2015; 60 (5–6): 3–7. [in Russian]
22. Krylova N.V., Smolina T.P., Leonova G.N. Molecular Mechanisms of Interaction between Human Immune Cells and Far Eastern Tick-Borne Encephalitis Virus Strains. *Viral Immunology* 2015; 28: 272–281.
23. Craston R., Koh M., McDermott A., Ray N., Prentice H.G., Lowdell M.W. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. *J Immunol Methods* 1997; 10: 37–45.
24. Cheadle W.G. The human leukocyte antigens and their relationship to infection. *Am J Surg* 1993; 165 (2A Suppl): 75–81.
25. Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Meth* 2004; 294: 15–22.
26. Betts M.R., Koup R.A. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol* 2004; 75: 497–512.
27. Chen S., Wu Z., Wang M., Cheng A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses* 2017; 9: 291–310.
28. Pastorino B., Nougaiere A., Wurtz N., Gould E., de Lamballerie X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Research* 2010; 87: 281–294.
29. Bastos J.C.S., de Menezes C.B.A., Fantinatti-Garboggini F., Padilla M.A., Arns C.W., Kohn L.K. Antiviral Activity of Marine Actinobacteria against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. *RRJMB* 2015; 4: 55–62.
30. Wang W., Wang S.X., Guan H.S. The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview. *Mar Drugs* 2012; 10: 2795–2816.
31. Miorin L., Maestre A.M., Fernandez-Sesma A., Garcia-Sastre A. Antagonism of type I interferon by flaviviruses. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 492: 587–596.
32. Overby A.K., Popov V.L., Niedrig M., Veber F. Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. *J Virology* 2010; 84: 8470–8483.
33. Shevtsova A.S., Motuzova O.V., Kuragina V.M., Karganova G.G. Lethal Experimental Tick-Borne Encephalitis Infection: Influence of Two Strains with Similar Virulence on the Immune Response. *Frontiers in Microbiology* 2017; 7: Article 2172.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Крылова Наталья Владимировна — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

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

Берлизова Мария Владимировна — м. н. с. лаборатории флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Леонова Галина Николаевна — д. м. н., профессор, зав. лабораторией флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Определение чувствительности штамма вируса гриппа А(Н7N9) к противовирусным препаратам *in vitro* и *in vivo*

*М. А. СКАРНОВИЧ, М. О. СКАРНОВИЧ, Л. Н. ШИШКИНА,
Н. И. БОРМОТОВ, А. Б. РЫЖИКОВ, А. П. АГАФОНОВ

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., п. Кольцово

Determination of Sensitivity of Influenza Virus Strain A(H7N9) to Antiviral Drugs *In Vitro* and *In Vivo*

*M. A. SKARNOVICH, M. O. SKARNOVICH, L. N. SHISHKINA, N. I. BORMOTOV, A. B. RYZHIKOV, A. P. AGAFONOV

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Novosibirsk region, Koltsovo

Исследована фенотипическая чувствительность штамма вируса гриппа A/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам различного механизма действия в культуре клеток MDCK и в опытах на аутбредных мышах ICR. В экспериментах *in vitro* штамм вируса гриппа A/Anhui/1/2013 (H7N9) проявлял наиболее высокую чувствительность к Тамифлю, тогда как к Ингавирину и Римантадину чувствительность данного штамма вируса гриппа была менее выраженной. В экспериментах *in vivo* штамм A/Anhui/1/2013 (H7N9) проявлял абсолютную чувствительность только к Тамифлю при исследовании таких показателей как титры вируса в лёгких, коэффициент защиты и средняя продолжительность жизни животных. Чувствительности данного штамма вируса гриппа к Ингавирину в использованной дозе и схеме введения *in vivo* обнаружено не было. К Римантадину чувствительность данного штамма *in vivo* была значительно более слабой, чем к Тамифлю, и проявлялась только в снижении титров вируса в лёгких через 3 сут после заражения мышей.

Ключевые слова: вирус гриппа A(H7N9), чувствительность к препарату, противовирусная активность, *in vitro*, *in vivo*.

The phenotypic sensitivity of the influenza virus strain A/Anhui/1/2013 (H7N9) to antiviral drugs with different mechanisms of action in the MDCK cell culture and in outbred ICR mice experiments was observed. The A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain of influenza virus showed the highest sensitivity to Tamiflu in *in vitro* experiments, whereas the sensitivity of this influenza virus strain to Rimantadine and Ingavirin was less pronounced. The A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain exhibited absolute sensitivity only to Tamiflu in *in vivo* studies of such factors as virus titers in the lungs, the protection factor, and the average life expectancy of the animals. The sensitivity of this strain of influenza virus to Ingavirin was not detected in dose and administration regimen used *in vivo*. Rimantadine sensitivity of this strain *in vivo* was significantly weaker than to Tamiflu, and manifested only in reducing viral titers in the lungs 3 days after the mice were infected.

Keywords: influenza virus A(H7N9), drug sensitivity, antiviral activity, *in vitro*, *in vivo*.

Высокий уровень заболеваемости гриппом во время ежегодных эпидемий, а также возможность развития тяжёлых осложнений заболевания остаются актуальными медицинскими и социально-экономическими проблемами здравоохранения. Сезонная заболеваемость вызывается штаммами вируса гриппа А двух субтипов H1N1 и H3N2, при этом каждый год возникают их разновидности с изменёнными генетическими и биологическими свойствами. Кроме того, практически ежегодно появляется информация о возникновении вспышек заболеваний, вызванных новыми штаммами вируса гриппа, которые раньше не выявлялись у людей, и представляют собой реассортанты субтипов вируса

гриппа А, циркулирующих в популяциях людей, птиц и свиней [1].

В марте 2013 г. органы здравоохранения Китая сообщили о трёх случаях лабораторно подтверждённого заражения людей вирусом гриппа птиц А(Н7N9) [2]. Уже через 2 мес. после первого сообщения было зарегистрировано 132 случая заражения вирусом гриппа птиц А(Н7N9), 39 из них закончились смертельным исходом [3]. По данным CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Китая, на 24 февраля 2017 г. зарегистрировано 1258 лабораторно подтверждённых случаев заражения вирусом гриппа птиц А(Н7N9), из которых 516 (41%) случаев закончились смертельным исходом [4]. У большинства пациентов первоначально развивалось гриппоподобное заболевание, которое впоследствии прогрессировало до респираторного дистресс-синдрома, приводившего к госпитализации [5, 6]. Многие пациен-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: skarnovich_ma@vector.nsc.ru

ты, заболевшие гриппом А(Н7N9), контактировали с домашней птицей, как правило, на рынках живой птицы [5, 6]. В настоящее время не существует вакцины от гриппа А(Н7N9). Исследования штаммов вируса гриппа А(Н7N9), выделенных от человека, свидетельствуют о том, что они устойчивы к адамантановым противовирусным химиопрепаратам, но восприимчивы к ингибиторам нейраминидазы — Осельтамивиру, Занамивиру и Перамивиру [7, 8].

Антивирусная терапия является важнейшей составляющей комплексного лечения гриппа. Например, как было показано, вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 чувствителен к Осельтамивиру и Занамивиру, а также Ингавирину, поэтому Министерство здравоохранения Российской Федерации рекомендует эти препараты для лечения тяжёлого и осложнённого гриппа [9]. Вместе с тем к настоящему времени отсутствует информация о чувствительности вируса гриппа А(Н7N9) к официально разрешённым противогриппозным препаратам с иными механизмами действия, чем ингибиторы нейраминидазы и М2-белка вируса.

Цель исследования — оценка фенотипической чувствительности штамма вируса гриппа А/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам (Тамифлю, Римантадин и Ингавирин) в культуре клеток MDCK и в экспериментах на аутбредных мышах ICR.

Материал и методы

В работе использовали штамм вируса гриппа (ВГ) А/Anhui/1/2013 (H7N9), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, доставленный туда из Сотрудничающего Центра ВОЗ (Китай). Штамм прошёл 4 пассажа на 9–10-суточных куриных эмбрионах (КЭ). Для наработки вируса КЭ заражали в аллантоисную полость и инкубировали в течение 2 сут при 37°C, после чего собирали вирус-содержащую аллантоисную жидкость (ВАЖ), осветляли центрифугированием при 4500 g в течение 1 ч при 0°C. Концентрацию вируса в ВАЖ определяли путём титрования в культуре клеток MDCK [10], рассчитывали и выражали в lg ТЦД₅₀/мл (десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в мл) по методу Спирмена–Кербера [11]. Значения титров вируса были представлены как $M \pm I_{95}$, где М — среднее значение, I_{95} — 95% доверительный интервал. Концентрация вируса в ВАЖ составляла $10,50 \pm 0,46$ lg ТЦД₅₀/мл. Нарботанную и использованную в работе серию ВАЖ с указанным титром хранили при температуре минус 70°C.

Для определения концентрации (титра) ВГ в работе использовали культуру клеток MDCK (эпителиоподобные клетки из почки самки кокер-спаниеля), полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки культивировали в 96-луночных культуральных планшетах до формирования полного монослоя в среде DMEM («Биолот», Россия) с использованием 10% сыворотки плодов коров («HyClone», США) и антибиотиков (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, Россия) при 37°C и 5% CO₂. В лунки вносили по 100 мкл последовательных десятикратных разведений вируса, приготовленных в среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 2 мкг/мл ТРСК трипсина («Sigma», США) и 0,2% бычьего сывороточного аль-

бумина («Sigma», США) [10]. Инфицированные клетки инкубировали в течение 4–5 сут при 37°C и 5% CO₂. Результаты учитывали визуально по цитопатическому действию вируса и в реакции гемагглютинации с 0,5% суспензией куриных эритроцитов, титр вируса рассчитывали по методу Спирмена–Кербера и выражали в lg ТЦД₅₀/мл [11].

В исследованиях *in vivo* использовали мышей аутбредной популяции ICR (обоёго пола, массой 13–15 г), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды, согласно ветеринарному законодательству, и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [12].

Для определения 50% летальной дозы (ЛД₅₀) ВГ по 6 мышей интраназально инфицировали десятикратными разведениями ВГ, вводя по 40 мкл суммарно в обе ноздри, что соответствовало дозам $10^{3,1}$, $10^{4,1}$, $10^{5,1}$, $10^{6,1}$, $10^{7,1}$, $10^{8,1}$ и $10^{9,1}$ ТЦД₅₀/мышь. В течение последующих 16 сут регистрировали гибель животных в каждой группе. На основании полученных данных о гибели животных рассчитывали титр ВГ в lg ЛД₅₀/мл ($\pm I_{95}$) и выражали величину ЛД₅₀ в lg ТЦД₅₀/мышь ($\pm I_{95}$) по методу Спирмена–Кербера [11]. При исследовании чувствительности штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) к препаратам *in vivo* для интраназального заражения мышей использовали 10 ЛД₅₀ ВГ/мышь.

В работе использовали коммерчески доступные в аптечной сети противовирусные препараты: ингибитор нейраминидазы — Тамифлю (Осельтамивира фосфат, Ля Рош Лтд., Швейцария), ингибитор М2-белка — Римантадин (Римантадина гидрохлорид, ОАО «Биосинтез», Россия) и ингибитор миграции вновь синтезированного белка NP вируса из цитоплазмы в ядро — Ингавирин (Имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты, ОАО «Валента Фармацевтика», Россия).

В культуре клеток препараты применяли в нетоксических для клеток MDCK концентрациях, установленных и использованных ранее в экспериментах *in vitro* с другими субтипами ВГ А [13, 14]: Тамифлю — 50 и 100 мкг/мл, Римантадин — 5 и 10 мкг/мл и Ингавирин — 100 и 200 мкг/мл. Фенотипическая чувствительность штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) к исследуемым препаратам оценивалась по изменению его инфекционности (титра) в культуре клеток MDCK по сравнению с контролем. При этом использовали 2 схемы внесения препаратов: в лунки 96-луночных планшетов с клеточным монослоем вносили по 150 мкл определённых разведений препаратов за 1 ч до или через 1 ч после инокуляции ВГ. Заражение клеточного монослоя осуществляли десятикратными разведениями ВГ (с 1-го по 10-е) в объёме 100 мкл. В контроле ВГ вместо препаратов использовали питательную среду в объёме 150 мкл. Через 5 сут культивирования инфицированного монослоя клеток определяли титры ВГ (в lg ТЦД₅₀/мл) и отличия между ними в каждой схеме применения препаратов и в соответствующем контроле по методу Спирмена–Кербера [11]. Кроме того, высчитывали индекс нейтрализации ВГ под влиянием препаратов (ИН, в lg), где ИН = Титр вируса в контроле — Титр вируса в опыте (lg) [15].

При оценке фенотипической чувствительности штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) к исследуемым препаратам в экспериментах на животных растворённые в дистиллированной воде препараты вводили перорально в объёме 0,2 мл через 1 ч после заражения и далее в течение 5 сут в дозах, ранее исследуемых нами в отношении других субтипов ВГ [13, 16]: Тамифлю 15 мкг/г массы мыши (2 раза в день), Римантадин 25 мкг/г (2 раза в день), Ингавирин 45 мкг/г (1 раз в день). Дозы препаратов для введения лабораторным животным рассчитывали с учётом доз, рекомендованных для человека, и зависимости скорости метаболизма введённого вещества от соотношения площади поверхности тела и массы животного [15, 17]. Инфицированным мышам в контрольной группе вместо препаратов вводили 0,2 мл дистиллированной воды 2 раза в день. Гибель животных регистрировали в течение 16 сут наблюдения после заражения ВГ. В каждой группе определяли долю выживших

Таблица 1. Инфекционность (титры) штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) в монослое клеток MDCK в присутствии препаратов в среде культивирования

Препараты (концентрация в среде культивирования)	Схема применения препаратов			
	за 1 ч до заражения		через 1 ч после заражения	
	титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл (M±I ₉₅ , n=6)	ИН (lg)	титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл (M±I ₉₅ , n=6)	ИН (lg)
Тамифлю (50 мкг/мл)	7,00±0,53* **	3,50	7,00±0,53* **	3,50
Тамифлю (100 мкг/мл)	7,50±0,00* **	3,00	7,67±0,53* **	2,83
Римантадин (5 мкг/мл)	8,83±0,55*	1,67	8,83±0,41*	1,67
Римантадин (10 мкг/мл)	8,83±0,41*	1,67	9,17±0,41*	1,33
Ингавирин (100 мкг/мл)	9,17±0,41*	1,33	9,33±0,33*	1,17
Ингавирин (200 мкг/мл)	9,00±0,53*	1,50	8,83±0,41*	1,67
Контроль ВГ (без препаратов)	10,50±0,53		10,50±0,33	

Примечание. * – отличие от контроля при $p \leq 0,01$; ** – отличие от всех других показателей в соответствующей схеме внесения препаратов при $p \leq 0,01$; n – число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса; M – среднее значение и I_{95} – 95%-й доверительный интервал, рассчитанные по методу Спирмена–Кербера.

животных, рассчитывали коэффициент защиты ($K3 = \% \text{ гибели в контроле} - \% \text{ гибели в опыте}$) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей. При оценке СПЖ учитывали число животных, проживших определённое количество дней после заражения до гибели и число выживших животных. За максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 сут после заражения ВГ, т. е. гарантированное время прекращения гибели инфицированных мышей, что было установлено эмпирически при многократном повторении аналогичных экспериментов [18]. Кроме того, через 1, 3, 5 и 8 сут после инфицирования определяли титры ВГ (в lg ТЦД₅₀/мл) в 10% гомогенатах лёгких инфицированных мышей в контрольной и опытных группах.

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли с помощью пакета компьютерных программ анализа данных «Statistica 7.0» [19]. Для проверки статистических гипотез о виде распределения показателей применяли критерий Колмогорова–Смирнова для вероятности ошибки – $p > 0,10$. Различия показателей титров вируса в лёгких между группами инфицированных животных оценивали с использованием t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна–Уитни. Показатели СПЖ представлены в виде $M \pm I_{95}$, где M – среднее арифметическое значение и I_{95} – доверительный интервал. Сравнение СПЖ мышей в разных группах проводили с использованием U -критерия Манна–Уитни. Различия показателей выживаемости животных оценивали с помощью кривых Каплана–Мейера по логранговому критерию [19]. Кроме того, при сравнении групп по доле выживших животных использовали критерий χ^2 с учётом поправки Йетса для малых выборок. Отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [19].

Результаты исследования

Фенотипическая чувствительность штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) к исследуемым противовирусным препаратам оценивалась *in vitro* по изменению его инфекционности (титра) в культуре клеток MDCK при использовании 2 схем внесения препаратов: за 1 ч до и через 1 ч после заражения монослоя.

Было обнаружено, что штамм ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) *in vitro* наиболее чувствителен к Тамифлю при обеих исследованных концентрациях и схемах применения, поскольку индексы нейтрализации ВГ в присутствии Тамифлю были наиболее высокими (табл. 1). Снижение титров штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) в присутствии

Римантадина и Ингавирина тоже происходило при обеих исследованных концентрациях и схемах применения, но было менее выраженным, чем в присутствии Тамифлю (табл. 1).

Далее была проведена оценка фенотипической чувствительности штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам в экспериментах на мышах аутбредной популяции ICR. Для этого предварительно оценили величину ЛД₅₀ вируса для этого вида животных при интраназальном способе инфицирования. Было показано, что титр используемого в работе ВГ составлял $5,27 \pm 0,60$ lg ЛД₅₀/мл, а величина ЛД₅₀, соответственно, была равна $5,23 \pm 0,46$ lg ТЦД₅₀/мышь. Для заражения мышей в экспериментах при введении противовирусных препаратов данный штамм ВГ использовали в дозе 10 ЛД₅₀ ($6,23 \pm 0,46$ lg ТЦД₅₀/мышь).

Чувствительность штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам *in vivo* определяли по изменению его репродукции в лёгких через 1, 3, 5 и 8 сут после заражения мышей в группах, получавших препараты, в сравнении с соответствующими значениями в контрольной группе.

В табл. 2 представлена динамика накопления ВГ в лёгких мышей в зависимости от времени после заражения штаммом ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9). Из приведённых данных следует, что уже через 8 сут продукция вируса снижалась и не отличалась во всех группах. Как было обнаружено, в экспериментах *in vivo* данный штамм ВГ обладал наибольшей чувствительностью к Тамифлю, о чём свидетельствует достоверное уменьшение титров вируса в лёгких мышей через 1, 3 и 5 сут после заражения при введении Тамифлю (табл. 2). При этом чувствительность к Римантадину была выражена меньше, поскольку достоверное снижение продукции вируса в лёгких относительно контроля наблюдалось только через 3 сут после заражения. Чувствительности данного штамма вируса

Таблица 2. Определение чувствительности вируса гриппа (ВГ) A/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам по динамике накопления ВГ в лёгких мышей при и/н заражении в дозе 10 ЛД₅₀

Группы животных, получавших препараты, и контрольная группа	Титры ВГ (lg ТЦД ₅₀ /мл) в лёгких мышей в разные сроки после заражения, М±I ₉₅			
	1 сут, n=5	3 сут, n=5	5 сут, n=5	8 сут, n=4
Тамифлю, 15 мкг/г	4,57±0,49*	6,30±0,23*	5,40±0,99*	0,90±0,56**
Римантадин, 25 мкг/г	5,57±0,29	5,70±0,17*	6,00±0,15	0,73±0,57**
Ингавирин, 45 мкг/г	5,70±0,40	6,50±0,15	5,90±0,33	0,60±0,17**
Контроль ВГ	5,30±0,45	6,70±0,35	6,40±0,63	0,70±0,29**

Примечание. * – отличие от Контроля по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна–Уитни при $p \leq 0,05$; ** – отличие от показателей в соответствующей группе в предыдущие сроки исследования по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна–Уитни при $p \leq 0,001$; М – среднее арифметическое значение, I₉₅ – 95% доверительный интервал; n – число животных в группе.

Таблица 3. Определение чувствительности вируса гриппа (ВГ) A/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам по показателям выживаемости мышей, инфицированных ВГ в дозе 10 ЛД₅₀

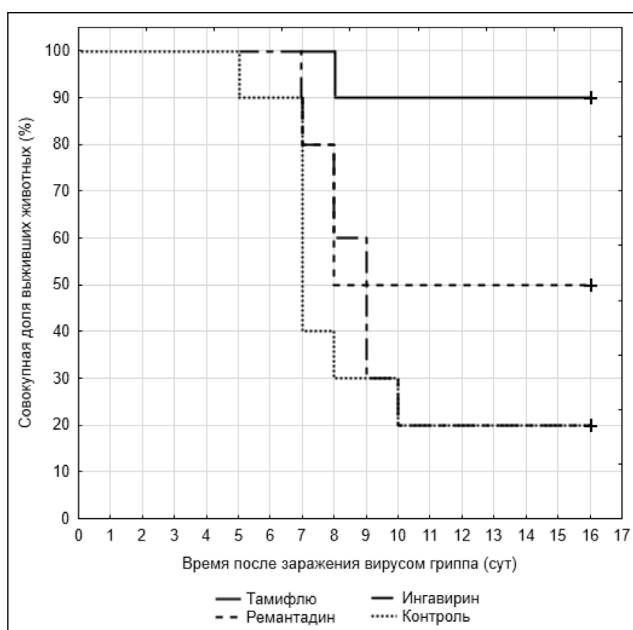
Группы животных, получавших препараты, и контрольная группа	Доза препарата в мкг/г массы мыши# (схема введения)	Число и доля (%) выживших животных	КЗ (%)	СПЖ (сут), М±I ₉₅
Тамифлю (n=10)	15 (2 раза в день)	9** (90)	70	15,2±1,8*
Римантадин (n=10)	25 (2 раза в день)	5 (50)	30	11,8±3,2
Ингавирин (n=10)	45 (1 раз в день)	2 (20)	0	9,9±2,4
Контроль ВГ (n=10)	0	2 (20)	—	9,0±2,8

Примечание. # – препараты вводили перорально в объёме 0,2 мл воды; * – отличие от Контроля по *U*-критерию Манна–Уитни при $p=0,005$; ** – отличие от Контроля по критерию χ^2 с поправкой Йетса при $p=0,007$. Коэффициент защиты (КЗ) рассчитывали по формуле: КЗ = % гибели в контроле – % гибели в опыте. СПЖ – средняя продолжительность жизни (за максимальный срок жизни выживших животных принимали 16 сут, т. е. эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели инфицированных ВГ мышей). М – среднее арифметическое значение; I₉₅ – 95% доверительный интервал; n – число животных в каждой группе.

гриппа к Ингавирину в использованной дозе и схеме введения *in vivo* обнаружено не было, судя по отсутствию снижения титров ВГ относительно соответствующих контрольных показателей на всех сроках исследования (см. табл. 2).

Кроме того, проводили оценку чувствительности штамма ВГ A/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам *in vivo* по показателям выживаемости мышей при интраназальном заражении этим штаммом ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ и пероральном введении исследованных препаратов. Было обнаружено, что наиболее выраженной чувствительностью *in vivo* данный штамм ВГ обладал к Тамифлю (Озельтамивиру), о чём свидетельствует увеличение СПЖ и число выживших инфицированных животных (табл. 3). В экспериментах на животных при их инфицировании ВГ A/Anhui/1/2013 (H7N9), данный вирус не проявлял чувствительности к Ингавирину в выбранной нами дозе 45 мкг/г, о чём можно судить по отсутствию достоверного отличия от контроля по показателям СПЖ и доли выживших животных. В группе мышей, получавших Римантадин, также отсутствовали достоверные отличия от контроля по обоим показателям выживаемости (см. табл. 3).

Анализ кривых выживаемости Каплана–Мейера, представленных на рисунке, выявляет значимые отличия между контрольной группой мышей,



Графики выживаемости животных, построенные по методу Каплана–Мейера, при заражении штаммом ВГ A/Anhui/1/2013 (H7N9) в дозе 10 ЛД₅₀ в контрольной группе и при введении препаратов.

Примечание. «+» – окончание срока наблюдения, т. е. эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели мышей, инфицированных ВГ.

инфицированных штаммом ВГ А/Anhui/1/ 2013 (H7N9) в дозе 10 ЛД₅₀, и группой инфицированных мышей, получавших Тамифлю ($p=0,00183$). При этом отличий выживаемости инфицированных мышей при введении Ингавирина от показателей в контрольной группе не было ($p=0,48551$), хотя в группе инфицированных мышей, получавших Римантадин, наблюдалась тенденция к повышению показателей выживаемости ($p=0,10595$).

Обсуждение результатов

В данной работе представлены результаты исследования фенотипической чувствительности штамма ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам, которую принято оценивать наряду с соответствующими известными генотипическими маркерами [20]. Считают, что новые вирусы гриппа А(H7N9) являются первыми слабопатогенными вирусами гриппа птиц, которые, как было зарегистрировано, вызывают тяжёлое заболевание у человека [21]. При этом генетические характеристики штаммов вируса гриппа А(H7N9) позволяют предположить наличие у них пандемического потенциала, поскольку они обладают способностью связываться с рецепторами вируса гриппа птиц и человека: остатками сиаловых кислот с α -2,3- и α -2,6-последовательностями, соответственно, и реплицироваться в организме человека [22].

Поскольку клеточные сиаловые рецепторы с α -2,3-последовательностью присутствуют на поверхности клеток респираторного тракта как у людей, так и у мышей, патогенетические характеристики штаммов вируса гриппа А(H7N9) были исследованы в экспериментах на мышах [23, 24]. Авторами данных публикаций было установлено, что ЛД₅₀ штамма А/Anhui/1/2013 (H7N9) для мышей линии Balb/c составляла 3,4 lg БОЕ (бляшкообразующих единиц) [23] и 6,3 lg ТЦД₅₀ [24]. Полученные нами и другими авторами величины ЛД₅₀ изолятов ВГ субтипа А(H7N9), выделенных в 2013 г. в Китае, свидетельствуют о том, что при заражении лабораторных мышей они проявляли умеренные патогенные свойства по сравнению с высокопатогенным вирусом гриппа птиц А(H5N1) [23–25]. Вместе с тем, высокий уровень заболеваемости людей, вызванный вирусом гриппа птиц субтипа А(H7N9), и обнаружение его устойчивости к препаратам адамантанового ряда диктует необходимость исследования его чувствительности к различным по механизму действия противовирусным препаратам.

В предыдущих наших исследованиях при использовании Римантадина чувствительными к нему *in vitro* и *in vivo* были штаммы ВГ субтипов А(H3N2) и А(H5N1), а нечувствительными — штаммы пандемического ВГ А(H1N1) [14, 16]. При этом чувствительностью к Тамифлю и Ингавиру при их использовании в таких же концен-

трациях *in vitro* и дозах *in vivo* обладали штаммы ВГ субтипов А(H3N2), А(H5N1) и А(H1N1) [13, 14, 16]. Полученные нами и данные литературы дают основания утверждать, что разные субтипы вируса гриппа А обладают неодинаковой чувствительностью к противовирусным препаратам.

В данной работе впервые приведены обобщённые данные сравнительной оценки чувствительности штамма А/Anhui/1/2013 (H7N9) к противовирусным препаратам в экспериментах на клеточных культурах и лабораторных мышах. В проведённых нами исследованиях было обнаружено, что штамм ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) проявлял очень высокую чувствительность к Тамифлю в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*, тогда как к Римантадину и Ингавиру его фенотипическая чувствительность была выражена значительно меньше. С учётом того, что в данной работе и ранее [13, 14, 16] Римантадин и Ингавирин были использованы нами в максимальных дозах, превышающих в 20 раз дозы, рекомендованные для человека [15, 17], применение их в более высоких дозах *in vivo* для достижения чувствительности ВГ А(H7N9) являлось необоснованным. Полученные нами результаты подтверждают необходимость поиска новых лекарственных препаратов с различными механизмами действия в отношении высокопатогенного вируса гриппа А/H7N9 и исследования их активности с использованием моделей гриппозной инфекции *in vitro* и *in vivo* с целью лечения и предотвращения распространения заболеваний, вызванных субтипами вируса гриппа А с пандемическим потенциалом.

Заключение

Таким образом, в экспериментах *in vitro* было установлено, что штамм ВГ А/Anhui/1/2013 (H7N9) проявлял наиболее высокую фенотипическую чувствительность к Тамифлю, в то время как к Ингавиру и Римантадину чувствительность данного штамма ВГ была менее выраженной.

В экспериментах на мышах, интраназально инфицированных этим штаммом ВГ, было показано наличие его абсолютной чувствительности только к Тамифлю, что подтверждается достоверным снижением концентрации ВГ в лёгких, а также увеличением доли выживших животных и продолжительности их жизни. Чувствительности данного штамма вируса гриппа к Ингавиру в использованной дозе и схеме введения *in vivo* обнаружено не было. К Римантадину фенотипическая чувствительность данного штамма *in vivo* была значительно более слабой, чем к Тамифлю, и проявлялась только в снижении титров вируса в лёгких через 3 сут после заражения мышей.

Результаты данных исследований были получены в рамках выполнения государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Expert Opinion on neuraminidase inhibitors for prevention and treatment of influenza 2016 [26/01/2017]. URL: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/neuraminidase-inhibitors-flu-consultation.pdf>.
- Food and agriculture organization of the united nations, 2017. URL: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H7N9/background.html>.
- Zhou J., Wang D., Gao R., Zhao B., Song J., Qi X. et al. Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus. *Nature* 2013; 61: 500–503.
- Iuliano A.D., Jang Yu., Jones J., Davis C.T., Wentworth D.E., Uyeki T.M. et al. Increase in human infections with avian influenza A(H7N9) virus during the fifth epidemic — China, October 2016 — February 2017. *Weekly / March 10, 2017; 66 (9): 254–255*. URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6609e2.htm>.
- Gao R., Cao B., Hu Y., Feng Z., Wang D., Hu W. et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *The New England journal of medicine* 2013; 368 (20): 1888–1897.
- Li Q., Zhou L., Zhou M., Chen Z., Li F., Wu H. et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China. *The New England journal of medicine*. 2013; 370: 520–532.
- Watanabe T., Kiso M., Fukuyama S., Nakajima N., Imai M., Yamada S. et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 2013; 501 (7468): 551–555.
- Cao R.Y., Xiano J.H., Cao B., Li S., Kumaki Y., Zhong W. Inhibition of novel reassortant avian influenza H7N9 virus infection *in vitro* with three antiviral drugs, oseltamivir, peramivir and favipiravir. *Antivir Chem Chemother* 2014; 23: 237–240, doi: 10.3851/IMP2672.
- Методические рекомендации по диагностике и лечению гриппа. Министерство здравоохранения Российской Федерации, М.: 2016. URL: https://petrsu.ru/files/user/fdbd9903df09bb6f04f397450a13732b/Recom_Flu.pdf.
- Virology Methods Manual Edited by: Brian W. J. Mahy and Hillar O. Kangro. Academic Press. 1996; 374.
- Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976. — 598 с. / Zaks L. Statisticheskoe otsenivanie. M.: Statistika; 1976; 598. [in Russian]
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Перевод с английского. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. — 138 с. / Rukovodstvo po sodержaniyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh. Perevod s anglijskogo. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996; 138. [in Russian]
- Онищенко Г.Г., Агафонов А.П., Демина О.К., Сергеев А.А., Терновой В.А., Шишкина Л.Н. и др. Свойства штаммов пандемического вируса гриппа, выделенных на территории России. Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — Т. 101. — № 3. — С. 5–9. / Onishchenko G.G., Agafonov A.P., Demina O.K., Sergeev A.A., Ternovoj V.A., Shishkina L.N. i dr. Svoystva shtammov pandemicheskogo virusa grippa, vydelennykh na territorii Rossii. Problemy osobo opasnykh infektsij 2009; 101: 3: 5–9. [in Russian]
- Шишкина Л.Н., Небольсин В.Е., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Эрдынеева У.Б., Мазуркова Н.А. и др. Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1/09)v. Антибиотики и химиотер. — 2010. — Т. 55. — № 3–4. С. 12–16. / Shishkina L.N., Nebol'sin V.E., Kabanov A.S., Skarnovich M.O., Erdynееva U.B., Mazurkova N.A. i dr. Izuchenie effektivnosti Ingavirina® *in vitro* v otnoshenii shtammov pandemicheskogo virusa grippa A(H1N1/09)v. Antibiotiki i khimioter 2010; 55: 3–4: 12–16. [in Russian]
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /Под ред. Хабриева Р.У. М.: Медицина, 2005. — 832 с. / Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniiyu novykh farmakologicheskikh veshchestv /Pod red. Khabrieva R.U. M.: Meditsina, 2005; 832. [in Russian]
- Шишкина Л.Н., Небольсин В.Е., Скарнович М.О., Кабанов А.С., Сергеев А.А., Эрдынеева У.Б. и др. Изучение эффективности Ингавирина® *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1/09)v. Антибиотики и химиотер. — 2010. — Т. 55. — № 5–6. — С. 32–35. / Shishkina L.N., Nebol'sin V.E., Skarnovich M.O., Kabanov A.S., Sergeev A.A., Erdynееva U.B. i dr. Izuchenie effektivnosti Ingavirina® *in vivo* v otnoshenii shtammov pandemicheskogo virusa grippa A(H1N1/09)v. Antibiotiki i khimioter 2010; 55: 5–6: 32–35. [in Russian]
- Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Онищенко Ф.А. Проблема нормы в токсикологии. 2-е изд. М.: Медицина, 1991. — 208 с. / Trakhtenberg I.M., Sov R.E., Sheftel' V.O., Onikienko F.A. Problema normy v toksikologii. 2-e izd. M.: Meditsina, 1991; 208. [in Russian]
- Скарнович М.О., Шишкина Л.Н., Кабанов А.С., Мазуркова Н.А., Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Дроздов И.Г. Эффективность комбинированного применения ридостина и озельтамивира (тамифлю) для лечения и профилактики экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа (H5N1) у мышей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2011. — № 5. — С. 79–82. / Skarnovich M.O., Shishkina L.N., Kabanov A.S., Mazurkova N.A., Danilenko E.D., Masycheva V.I., Drozdov I.G. Effektivnost' kombinirovannogo primeneniya ridostina i ozel'tamivira (tamiflyu) dlya lecheniya i profilaktiki eksperimental'noj infektsii, vyzvannoj virusom grippa (H5N1) u myshej. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii 2011; 5: 79–82. [in Russian]
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера, 2006. — 312 с. / Rebrova O.Yu. Statisticheskij analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA. M.: Media Sfera, 2006; 312. [in Russian]
- Шмелева Н.П., Грибкова Н.В., Яцышина С.Б., Миненко А.Н. Чувствительность к Римантадину и озельтамивиру вирусов гриппа А, изолированных на территории Республики Беларусь. Военная медицина. — 2008. — № 4 (9). — С. 95–98. / Shmeleva N.P., Gribova N.V., Yatsyshina S.B., Minenko A.N. Chuvstvitel'nost' k Rimantadinu i ozel'tamiviru virusov grippa A, izolirovannykh na territorii Respubliki Belarus'. Voennaya meditsina 2008; 4 (9): 95–98. [in Russian]
- Human infection with avian influenza A(H7N9) virus Fifth update, 27 January 2017. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 2017. URL: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/rra-influenza-a-h7n9-update-five.pdf>.
- Watanabe T., Watanabe S., Maher E.A., Neumann G., Kawaoka Y. Pandemic potential of avian influenza A(H7N9) viruses. *Trends Microbiol* 2014; 22 (11): 623–631.
- Belser J.A., Gustin K.M., Pearce M.B., Maines T.R., Zeng H., Pappas C. et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* 2013; 501: 556–559.
- Xu L., Bao L., Deng W., Zhu H., Chen T., Lv Q. et al. The mouse and ferret models for studying the novel avian-origin human influenza A (H7N9) virus. *Virology Journal*, 2013; 10: 253. URL: <http://www.virology.com/content/10/1/253>.
- Mok C.K.P., Lee H.H.Y., Chan M.C.W., Sia S.F., Lestra M., Nicholls J.M. et al. Pathogenicity of the novel A/H7N9 influenza virus in mice. *mBio* 2013; 4 (4): e00362–13. doi: 10.1128/mBio.00362–13.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Скарнович Мария Александровна — младший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

Скарнович Максим Олегович — научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

Шишкина Лариса Николаевна — д. б. н., заведующая отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

Бормотов Николай Иванович — заведующий лабораторией химических препаратов отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

Рыжиков Александр Борисович — к. б. н., заведующий отделом зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

Агафонов Александр Петрович — д. б. н., заместитель генерального директора по научной работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

Изучение эффективности Ридостина® при экспериментальной форме тяжёлого острого респираторного синдрома

С. Я. ЛОГИНОВА¹, В. Н. ЩУКИНА¹, *С. В. БОРИСЕВИЧ¹, Р. А. ХАМИТОВ², В. А. МАКСИМОВ¹

¹ ФГБУ 48 ЦНИИ МО РФ Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, *Сергиев Посад*

² ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум»

Studying the Effectiveness of Ridostin® in the Experimental Form of Severe Acute Respiratory Syndrome

S. YA. LOGINOVA¹, V. N. SHCHUKINA¹, *S. V. BORISEVICH¹, R. A. HAMITOV², V. A. MAKSIMOV¹

¹ 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, *Sergiev Posad*

² ООО International Biotechnology Center «Generium», *Moscow*

Проведены исследования по изучению эффективности высокомолекулярного индуктора интерферона Ридостина® в отношении экспериментальной формы тяжёлого острого респираторного синдрома у сирийских хомяков. Показано, что Ридостин® эффективен при применении его по профилактической схеме и схеме экстренной профилактики. Коэффициент лечебного действия составил 47,5 и 55,0%, соответственно. При этом был отмечен статистически высокий уровень достоверных отличий тяжести течения заболевания у животных, принимавших препарат по схеме экстренной профилактики и контрольных животных ($p \leq 0,05$).

Ключевые слова: Ридостин®, тяжёлый острый респираторный синдром, профилактика, коэффициент лечебного действия.

Studies have been carried out on the effectiveness of the high molecular weight interferon inducer Ridostin® in relation to the experimental form of severe acute respiratory syndrome in Syrian hamsters. It is shown that Ridostin® is effective when used according to the prophylaxis regimen and post-exposure prophylaxis regimen. The coefficient of therapeutic effect was 47.5 and 55.0%, respectively. At the same time, there was a statistically high level of significant differences in the severity of the disease in animals treated with the medication according to the post-exposure prophylaxis regimen and control animals ($P \leq 0.05$).

Keywords: Ridostin®, severe acute respiratory syndrome, prevention, coefficient of therapeutic action.

Введение

В ноябре 2002 г. в Южном Китае возникла вспышка тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС), которая затронула 30 стран [1–5]. В последние годы выявили новый коронавирус — возбудитель заболевания ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [6–7]. Актуальность поиска эффективных средств защиты в отношении этого заболевания несомненна.

Цель работы — оценка противовирусной эффективности высокомолекулярного индуктора интерферона Ридостина® в отношении возбудителя тяжёлого острого респираторного синдрома.

Материал и методы

Вирусы. В работе использовали вирус тяжёлого острого респираторного синдрома, штамм СоД, выделенный специалистами ВЦ НИИМ из носоглоточного смыва больного ТОРС из Благовещенска [7]. Хранился при температуре минус ($70 \pm 10,0$)°C в лиофилизированном виде.

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 141306, г. Сергиев Посад-6. 48 ЦНИИ

Культура клеток. Использована перевиваемая культура клеток почек зелёных мартышек — Vero E6. В качестве среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Хенкса, содержащую 2% сыворотки крупного рогатого скота, соответственно. Перед применением препараты растворяли в физиологическом растворе. ИИФ вводили внутримышечно по схемам профилактики, лечебно-профилактической, лечебной.

Исследуемый препарат. Ридостин® (инъекционный) — дрожжевая дс РНК, производства ЗАО «ВЕКТОР-МЕДИКА», Кольцово, Россия, серия 51204.

Лабораторные животные. Использованы сирийские хомяки массой 40–60 г. Животных заражали перорально в дозе 5,0gBO1E. Сразу после инфицирования животным всех групп вводили линкомицин в дозе 10^3 ед. внутримышечно [8]. Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 21 сут., контролировали клинические признаки заболевания, гибель животных. На 2-, 4-, 6- и 10-е сутки у инфицированных животных тотально отбирали кровь для проведения гематологических и биохимических исследований.

Токсичность исследуемых препаратов оценивали на неинфицированных сирийских хомяках.

Оценка противовирусной эффективности Ридостина® осуществлена в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ [9].

Основными критериями оценки эффективности являлись показатели снижения уровня накопления вируса в лёгких (Δ Ig) и уровня лейкоцитоза, нормализация биохимичес-

ких показателей крови (АлАТ, АсАТ, КФК, ЛДГ, мочевины и креатинина) и лейкограммы [10].

Результаты исследования

Эффективность высокомолекулярного индуктора интерферона Ридостина® оценивали по комплексу клинико-вирусологических показателей (биохимических, вирусологических, гематологических).

Данные вирусологического обследования сирийских хомяков, инфицированных перорально вирусом ТОРС, штамм СоД в дозе 5,0 lg БОЕ и получавших внутримышечно Ридостин® в дозе 5 мг/кг, показывают, что препарат эффективно подавляет репродукцию вируса в лёгких на пике инфекции (4-е сутки после инфицирования сирийских хомяков) при применении по профилактической схеме. Коэффициент ингибирования вируса ТОРС в ткани лёгких при введении препарата составил 99,2%.

Патологоанатомические исследования показали, что применение Ридостина® снижало тяжесть поражения лёгких. Обширность кровоизлияний и отёчность ткани лёгкого на 4-е и 6-е сутки была выражена в меньшей степени, чем у животных, инфицированных вирусом ТОРС. На 10-е сутки после инфицирования у животных, которым вводили внутримышечно препарат, отёки в лёгких отсутствовали, точечные кровоизлияния отмечали в единичных случаях в области лёгких, расположенной ближе к входам в бронхи.

Среди методов, дающих возможность объективной оценки течения патологического процесса в организме, видное место занимает лабораторное исследование крови.

Была проведена оценка влияния исследуемого препарата на динамику изменения суммарного пула лейкоцитов и лейкоцитарной формулы крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС.

У инфицированных животных на протяжении всего срока наблюдения выявлен повышенный уровень лейкоцитов ($12,0\text{--}12,8 \times 10^3/\text{мкл}$) по сравнению с интактными животными ($6,0\text{--}6,6 \times 10^3/\text{мкл}$). Введение Ридостина® сопровождалось небольшим лейкоцитозом только на 2- и 4-е сутки наблюдения ($8,0\text{--}8,4 \times 10^3/\text{мкл}$). Следует отметить, что по степени выраженности лейкоцитоза можно судить о реактивности организма при воспалительных процессах. Выраженный лейкоцитоз свидетельствует, как правило, о хорошей реактивной способности организма. Однако и при значительных лейкоцитозах не всегда прогноз может быть благоприятным, так как состояние жизненно важных органов и систем может быть неудовлетворительным. Поэтому наряду с определением количества лейкоцитов уделяют большое внимание соотношению различных групп клеток в лейкоцитарном пуле — лейкоцитарной

формуле крови. Для крови здоровых животных характерно наличие в ней более или менее зрелых форменных элементов. Сдвиг влево, когда в крови появляются молодые формы нейтрофилов, свидетельствует о неблагоприятных изменениях. Таким образом, анализ лейкограммы является ценнейшим методом клинического исследования. В лейкограмме нередко обнаруживаются такие изменения, которые возникают задолго до проявления клинических признаков заболевания и указывают на серьёзные сдвиги в течении развивающегося патологического процесса в организме.

Анализ лейкограммы крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, показывает, что с развитием инфекции у животных наблюдается относительный нейтрофилез (причём, происходит увеличение как сегментоядерных, так и палочкоядерных форм).

Отмечено появление на пике инфекции молодых форм нейтрофилов. Индекс сдвига (ИС) для интактных сирийских хомяков составил 0,11, для инфицированных (на пике инфекции) — 0,24. Таким образом, происходит сдвиг лейкограммы влево, что характерно для многих тяжёлых инфекций, когда увеличение количества нейтрофилов происходит в основном за счёт увеличения количества палочкоядерных и юных форм. Кроме того, отмечали с 4-х суток снижение относительного количества лимфоцитов.

При применении Ридостина® по профилактической схеме было отмечено угнетение гранулопоэза и увеличение количества лимфоцитов (ИС=0,38) с нарастанием лимфоцитоза к 10-м суткам наблюдения. При экстренной профилактике ТОРС у сирийских хомяков высокомолекулярными ИИФ отмечена активизация гранулоцитарной фракции лейкоцитов, при этом значение ИС составляло 0,82–1,43 (на 4-е сутки после инфицирования). На 6–10 сутки этот показатель снизился, но был достоверно выше значения у группы интактных животных.

Исследования по изучению влияния Ридостина® на биохимические показатели крови инфицированных сирийских хомяков показали, что наибольшую активность в процессе нормализации показателей КФК выявил препарат, вводимый по профилактической схеме (табл. 1). У животных, которым вводили Ридостин®, уровень КФК оставался достоверно ниже, чем у инфицированных животных, не получавших препарат. На 6-й день после заражения у группы животных, получавших Ридостин® по профилактической схеме, этот показатель соответствовал норме.

Уровень активности ЛДГ был значительно ниже по сравнению с группой контроля дозы вируса во время всего срока наблюдения.

Применение Ридостина® по профилактической схеме снижает активность аминотрансфераз

Таблица 1. Влияние Ридостина® на динамику изменения активности креатинфосфокиназы и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Схема введения препарата	Показатель	Значение показателей после инфицирования			
		2-е сутки	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки
-24, -1	Креатинфосфокиназа, $X \pm \sigma_x$, мккат/л	0,64±0,04	0,70±0,02	0,50±0,04	0,55±0,05
+2, +72, +144, +216		0,86±0,02	0,92±0,02	0,59±0,03	0,56±0,03
Контроль (инфицированные)		1,27±0,04	2,12±0,03	1,16±0,05	1,22±0,02
Контроль (интактные)		0,44±0,03	0,39±0,02	0,48±0,01	0,50±0,04
-24, -1	Лактатдегидрогеназа, $X \pm \sigma_x$, МЕ/л	652±12	501±7	472±14	512±6
+2, +72, +144, +216		574±14	512±8	491±11	607±11
Контроль (инфицированные)		1915±56	1447±54	1805±55	1803±15
Контроль (интактные)		405±32	402±15	409±13	399±18

Таблица 2. Влияние Ридостина® на динамику изменения активности аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Схема введения препарата	Показатель	Значение показателей после инфицирования			
		2-е сутки	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки
-24, -1	Аланинаминотрансфераза, $X \pm \sigma_x$, мкМ/(ч.л)	0,91±0,03	0,80±0,04	0,72±0,04	0,82±0,06
+2, +72, +144, +216		1,02±0,04	0,82±0,06	0,88±0,02	0,80±0,04
Контроль (инфицированные)		1,44±0,18	2,53±0,05	2,01±0,03	2,32±0,04
Контроль (интактные)		0,65±0,08	0,66±0,08	0,69±0,05	0,70±0,02
-24, -1	Аспартатаминотрансфераза, $X \pm \sigma_x$, мкМ/(ч.л)	0,88±0,04	0,72±0,04	1,01±0,03	1,12±0,04
+2, +72, +144, +216		0,86±0,02	0,79±0,03	1,12±0,04	1,25±0,02
Контроль (инфицированные)		2,14±0,09	2,62±0,04	1,85±0,06	2,23±0,07
Контроль (интактные)		0,71±0,09	0,73±0,09	0,71±0,06	0,74±0,02

Таблица 3. Влияние Ридостина® на динамику изменения креатинина и мочевины в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Схема введения препарата	Показатель	Значение показателей после инфицирования			
		2-е сутки	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки
-24, -1	Креатинин, $X \pm \sigma_x$, мкМ/л	175,1±1,1	162,4±0,6	152,4±0,6	180,1±0,6
+2, +72, +144, +216		176,3±0,7	156,8±0,8	148,8±0,4	180,4±0,4
Контроль (инфицированные)		210,0±1,0	255,7±1,0	247,9±0,3	213,5±0,5
Контроль (интактные)		181,2±0,8	184,5±0,4	180,2±0,2	180,5±0,5
-24, -1	Мочевина, $X \pm \sigma_x$, мМ/л	4,3±0,3	7,2±0,4	6,8±0,4	7,0±0,2
+2, +72, +144, +216		5,8±0,4	8,1±0,4	7,4±0,2	7,0±0,4
Контроль (инфицированные)		8,5±0,2	9,1±0,6	10,8±0,3	11,8±0,4
Контроль (интактные)		5,9±0,1	5,4±0,3	5,6±0,1	5,7±0,1

более чем в 3 раза по сравнению с группой животных, не получавших лечение (табл. 2). Уровень АЛАТ после повышения на 2-е сутки уже на 4–6 сут. не отличался от уровня этого показателя у интактных животных. На пике инфекции (4-е сутки) коэффициент де Ритиса у леченых Ридостином® сирийских хомяков составлял 0,90–0,96. Таким образом, препарат эффективно противодействовал поражению гепатоцитов.

При применении Ридостина® по всем изученным схемам не отмечено сколько-нибудь значительного увеличения концентрации креатинина в сыворотке крови сирийских хомяков по сравнению с интактными животными. На пике инфекции уровень его был в 1,5 раза ниже, чем у инфицированных животных, не получавших препарат.

Применение профилактической схемы Ридостина® также способствовало нормализации уровня мочевины в крови экспериментальных животных на 6–10 сутки после инфицирования, в то же время по схеме экстренной профилактики — уровень мочевины оставался достоверно выше по сравнению с интактными животными.

Для анализа влияния исследуемого препарата на тяжесть течения заболевания ТОРС у экспериментальных животных провели рейтинговую оценку степени выраженности следующих показателей: уровень накопления вируса в лёгких; степень патологоанатомических изменений внутренних органов; количество лейкоцитов; изменения в лейкоцитарной формуле крови; изменения ферментативной активности КФК, ЛДГ, АсАТ, АЛАТ; изменение концентрации мочевины и креатинина. Максимальная выраженность каждого из указанных признаков на пике инфекции (4–6 сутки) оценивалась в 4 балла.

По указанным признакам рассчитывали значения критерия знаков и соответствующие уровни значимости влияния исследуемых препаратов на течение инфекционного процесса в течение всего срока наблюдения (табл. 4).

Высокомолекулярный индуктор интерферона Ридостин® эффективно снижает тяжесть заболевания у сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС в дозе 5,0 Ig БОЕ, при введении его по профилактической

Таблица 4. Влияние Ридостина® на тяжесть течения инфекционного процесса у сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Препарат	Схема применения препарата	Анализ тяжести течения инфекционного процесса				
		на пике инфекции		в течении всего срока наблюдения		
		сумма баллов	индекс тяжести заболевания	коэффициент лечебного действия, %	значение критерия знаков	уровень значимости лечебной эффективности препарата, <i>p</i>
Ридостин®, 5мг/кг	-24 ч, -1 ч	21	0,525	47,5	7/10	доо
	+2,+72,+144,+216 ч	18	0,450	55,0	9/10	0,05
Контроль (инфицированные)	—	40	1,000	—	0/10	—

Примечание. доо — достоверные отличия отсутствуют

схеме и схеме экстренной профилактики. Коэффициент лечебного действия составил 47,5 и 55,0%, соответственно.

При этом был отмечен статистически высокий уровень достоверных отличий тяжести тече-

ния заболевания у животных, принимавших препарат по схеме экстренной профилактики и контрольных животных ($p \leq 0,05$).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Опищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А. и др. Выделение и идентификация возбудителя тяжёлого острого респираторного заболевания от больного атипичной пневмонией. ЖМЭИ. — 2003. — № 5. — С. 109–112. / Onishhenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A. i dr. Vy'delenie i identifikatsiya vzbuditel'ya tyazhelogo ostrogo respiratornogo zabolevaniya ot bol'nogo atipichnoj pnevmonij. ZhMEI 2003; 5: 109–112. [in Russian]
2. Синопальников А.И., Воробьев А.В., Белоцерковская Ю.Г., Андреева И.В. Тяжёлый острый респираторный синдром (ТОРС, SARS). Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2003. — № 5 (3). — С. 225–242. / Sinopal'nikov A.I., Vorob'ev A.V., Belocerkovskaya Yu.G., Andreeva I.V. Tyazhelyj ostryj respiratornyj sindrom (TORS, SARS). Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya ximioterapiya 2003; 5 (3): 225–242.
3. Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. New Engl J Med 2003; 348 (20): 1947–1958.
4. Lee N., Hui D., Wu A. et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome on Hong Kong. New Engl J Med 2003; 348 (20): 1986–1994.
5. Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet 2003; 361: 1319–1325.
6. Жуматов К.Х., Кыдырманов А.И. Ближневосточный респираторный синдром (mers-middleeastrespiratorysyndrome): новая коронавирусная инфекция человека и животных. Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика. — 2015. — № 3. — С. 4–10. / Zhumatov K.X., Kydyrmanov A.I. Blizhnevostochnyj respira-
7. Сыромятникова С.И., Писцов М.Н., Степанов Н.Н., Борисевич С.В., Меркулов В.А., Марков В.И., Опищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А. Штамм СоД вируса тяжёлого острого респираторного синдрома рода *Coronavirus*, предназначенный для разработки средств и методов биологической защиты. Патент РФ № 2263144, 27.10.2005. / Syromyatnikova S.I., Piszov M.N., Stepanov N.N., Borisevich S.V., Merkulov V.A., Markov V.I., Onishhenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A. Shtamm SoD virusa tyazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma roda *Coronavirus*, prednaznachennyj dlya razrabotki sredstv i metodov biologicheskoy zashchity. Patent RF № 2263144, 27.10.2005.
8. Zhao Z., Zhang F., Xu M. et al. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. J Med Microbiol 2003; 52: 715–720.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 2. М.: Минздрав РФ, 2013. / Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskix issledovanij lekarstvenny'x sredstv. Chast' 2. M.: Minzdrav RF, 2013. [in Russian]
10. Логинова С.Я., Фалдина В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В., Хамитов Р.А., Максимов В.А. Способ моделирования тяжёлого острого респираторного синдрома у экспериментальных животных. Патент РФ №2280288, 20.07.2006. / Loginova S.Ya., Faldina V.N., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V., Xamitov R.A., Maksimov V.A. Sposob modelirovaniya tyazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma u eksperimental'ny'x zhivotny'x. Patent RF №2280288, 20.07.2006.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Щукина Вероника Николаевна — к. б. н., научный сотрудник, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, член-корр. РАН РФ, начальник института, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Хамитов Равиль Авгатович — д. м. н., профессор, генеральный директор ООО МБЦ «Генериум», Москва

Максимов Владимир Алексеевич — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Москва

Региональные особенности микробного пейзажа в отделении реанимации и интенсивной терапии

Д. А. БАЛОЕВА, Ж. Б. ЭТЕЗОВА, З. А. КАМБАЧОКОВА,
Р. М. АРАМИСОВА, Е. М. ПШУКОВА, М. В. ГУРИЖЕВА, *М. М. ГАБАЕВА

ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Regional Features of the Microbial Landscape in the Intensive Care Unit

D. A. BALOEVA, ZH. B. ETEZOVA, Z. A. KAMBACHOKOVA, R. M. ARAMISOVA,
E. M. PSUKOVA, M. V. GURIZHEVA, *M. M. GABAEVA

Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik

В статье рассматриваются вопросы внутрибольничных инфекций в многопрофильной больнице. В результате исследований было установлено, что в спектре микроорганизмов, выделенных от больных находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии различного профиля, чаще высевались *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus vulgaris*. Ведущее место в микробной контаминации объектов окружающей среды также принадлежит *P.aeruginosa*. Выявлены различия спектра выявленных патогенов в отделениях реанимации и интенсивной терапии хирургического и неврологического профиля.

Ключевые слова: микробиологический мониторинг, чувствительность и резистентность к антибиотикам, отделение реанимации и интенсивной терапии.

The article discusses the issues of nosocomial infections in a general hospital. As a result of studies, it was found that *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus vulgaris* were more often found in the spectrum of microorganisms isolated from patients being treated in the intensive care units of various profiles. A leading place in the microbial contamination of environmental objects also belongs to *P.aeruginosa*. The differences in the spectrum of identified pathogens in the intensive care units and surgical and neurological intensive care units were revealed.

Keywords: microbiological monitoring, sensitivity and resistance to antibiotics, intensive care unit.

Актуальность проблемы

Несмотря на достижения в здравоохранении, проблема внутрибольничных инфекций (ВБИ) остаётся одной из острых в современных условиях, приобретая всё большую медицинскую и социальную значимость. По данным литературы, в зависимости от профиля стационара ВБИ развиваются у 5–30% больных и оказывают неблагоприятное влияние на прогноз и исход заболеваний, снижают эффективность антибактериальной терапии (АБТ), ухудшают эпидемиологическую ситуацию в плане распространения резистентных штаммов в стационаре [1–3].

Согласно статистическим данным, в России ежегодно возникает около 2 млн случаев ВБИ. По данным ряда исследований, уровень смертности в группе госпитализированных и приобретших внутрибольничные инфекции в 8–10 раз

превышает таковой среди госпитализированных без ВБИ [4–7]. Наибольший риск развития ВБИ имеется в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). В этой связи возникает необходимость тщательного микробиологического контроля. В ОРИТ хирургического профиля преобладают пациенты с комбинированными и ожоговыми травмами, поэтому риск появления и распространения микроорганизмов с поливалентной резистентностью особенно высок. В этих ситуациях нельзя ограничиваться определёнными схемами АБТ [8, 9].

Основными причинами высокой заболеваемости ВБИ в отделениях реанимации являются: высокая восприимчивость ослабленных пациентов, большая концентрация медицинского персонала и тесный контакт медицинских работников с пациентами, высокая частота использования инвазивных лечебно-диагностических манипуляций и процедур [8–11].

Долевое участие различных патогенов определяется рядом факторов: локализацией и характером патологического процесса, профилем ста-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: medfak1@bk.ru

ционара, характером и уровнем лабораторного обследования и др. Для каждого лечебного учреждения характерен свой спектр ведущих возбудителей ВБИ, который в течение времени может изменяться, например:

- в крупных хирургических центрах ведущими возбудителями постоперационных ВБИ являются золотистый и эпидермальный стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, энтеробактерии;

- в ожоговых стационарах ведущая роль принадлежит синегнойной палочке и золотистому стафилококку;

- в детских стационарах большое значение имеет занос и распространение детских капельных инфекций — ветряной оспы, краснухи, кори, эпидемического паротита [1, 2, 12].

Источниками ВБИ являются больные и бактерионосители из числа больных и персонала ЛПУ, среди которых наибольшую опасность представляет:

- медицинский персонал, относящийся к группе длительных носителей, и больные стертыми формами;

- длительно находящиеся в стационаре больные, которые нередко становятся носителями устойчивых внутрибольничных штаммов.

Выбор АБП для лечения инфекций у пациентов ОРИТ различных профилей является сложной задачей на современном этапе. При выборе схемы необходимо опираться на данные локального микробиологического мониторинга, в частности, антибиотикорезистентность проблемных патогенов [12–15].

Организационными формами микробиологического мониторинга в многопрофильной больнице являются:

- мониторинг, ориентированный на оценку санитарно-гигиенического режима в стационаре;

- мониторинг по слежению за циркуляцией всех микроорганизмов в стационаре для изучения и сравнения их биологических свойств;

- мониторинг для своевременного выявления внутрибольничных штаммов [3, 10].

Цель исследования: на основании микробного пейзажа культур, высеваемых из очагов гнойной инфекции, объектов внешней среды и рук медперсонала, оптимизировать антибактериальную терапию больных в ОРИТ.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- изучить региональные особенности видового состава циркулирующей в ОРИТ микрофлоры, выделенной из клинического материала пациентов и объектов внешней среды в многопрофильной больнице регионального уровня;

- установить антибиотикорезистентность основных патогенов к группам антибиотиков.

Материал и методы

Исследование проводилось в ОРИТ многопрофильной больницы, предназначенных для выхаживания тяжёлых больных неврологического и хирургического профиля.

В процессе исследования проводился анализ результатов лабораторных исследований биоматериалов пациентов (568 проб) из различных локусов (дыхательных, мочевых путей, кровеносного русла, раневых поверхностей, отделяемого дренажей, трахеобронхиального аспирата) и смывов с поверхностей окружающей среды (235 смывов для исследования микрофлоры кожи медперсонала).

Результаты и обсуждение

В обсуждение результатов исследования включены наиболее распространённые в отделении штаммы микроорганизмов, их чувствительность и резистентность к антибиотикам. Распределение выделенных микроорганизмов в ОРИТ неврологического профиля представлено в табл. 1.

Таблица 1. Частота выделения микроорганизмов в ОРИТ неврологического профиля

Вид микроорганизма	Частота высева, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25,3
<i>Proteus vulgaris</i>	25,3
<i>Enterobacter</i> spp.	16,3
<i>Staphylococcus</i> spp.	10
<i>Citrobacter</i> spp.	10
<i>Escherichia coli</i>	7,7
<i>Streptococcus</i> spp.	5,4

Как видно из табл. 1, чаще всего высеивалась синегнойная палочка (в 25,3% случаев). *P. aeruginosa* является условно-патогенным микроорганизмом, который может инфицировать глаза, уши, ожоги и раны. Он также является основной причиной приобретённых в больнице инфекций. Пациенты, проходящие курс лечения антибиотиками, особенно подвержены инфицированию *P. aeruginosa*. Данный микроорганизм является оппортунистическим патогеном, обладающим способностью группового поведения, включая образование биоплёнки и плавающую активность.

Инфекции, вызываемые синегнойной палочкой, потенциально более опасны, чем вызванные другими условно-патогенными микроорганизмами. Они часто развиваются у пациентов с ожогами, находящихся на искусственной вентиляции лёгких. Инфекция обычно локализуется в местах скопления и застоя жидкости: в трахеостомах, нижних отделах лёгких, постоянных катетерах мочевого пузыря, мокнущих ранах и др. Также актуальной проблемой является колонизации *P. aeruginosae* сосудистых катетеров. Чаще всего инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, локализируются в нижних отделах дыхательных путей и в мочевыводящих путях. К наиболее серьёзным состояниям следует относить ИВЛ-ассоциированные пневмонии [8, 9].

Результаты исследования показали, что данный возбудитель был чувствителен к ванкомицину в 89%, к меропенему — в 73,2%, к амоксициллину — в 14,3%.

Proteus spp. высевался в 25,3% случаев. Данный вид возбудителя был чувствителен к левофлоксацину в 35,7%, к цефоперазону — в 35,7% случаев.

Стафилококк высевался в 10% случаев. Он был наиболее чувствителен к меропенему (54,5%), офлоксацину (81,8%), цефтриаксону (81,8%), ванкомицину (81,8%).

Стрептококк высевался в 5,4% случаев. Наибольшая чувствительность стрептококка отмечалась к амоксициллину (в 66,7%). Стрептококк был чувствителен к ципрофлоксацину, офлоксацину, цефтриаксону, ванкомицину, левофлоксацину, имипенему. Устойчивость определялась к меропенему (в 33,3%), рифампицину (в 41,7%), цефоперазону (в 58,3%).

В табл. 2 представлены результаты исследования микробного пейзажа в ОРИТ хирургического профиля.

Таблица 2. Частота выделения микроорганизмов в ОРИТ хирургического профиля

Вид микроорганизма	Частота высева, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,7
<i>Enterobacter</i> spp.	16,5
<i>Staphylococcus</i> spp.	15,2
<i>Proteus vulgaris</i>	14,83
<i>Citrobacter</i> spp.	13,9
<i>Escherichia coli</i>	11,3
<i>Streptococcus</i> spp.	6,5

Как видно из табл. 2, у больных ОРИТ хирургического профиля и объектов внешней среды чаще всего высевалась синегнойная палочка. При этом отмечалась чувствительность *P. aeruginosa* к карбапенемам (меропенему (68%), имипенему (60%)), а также цефоперазону/сульбактаму (64%).

Enterobacter spp. проявлял чувствительность к карбапенемам (меропенему (55,3%), имипенему (50%)), азлоциллину (55,3%), цефтриаксону (52,6%), ципрофлоксацину (50%). Отмечалась резистентность к цефепиму, левофлоксацину, рифампицину.

ЛИТЕРАТУРА

- Акимкин В.Г. Группы внутрибольничных инфекций и системный подход к их профилактике в многопрофильном стационаре. Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2003. — № 3. — С. 15–18. / Akimkin V.G. Gruppy vnutribol'nichnykh infektsij i sistemnyj podkhod k ikh profilaktike v mnogoprofil'nom stacionare. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni 2003; 3: 15–18. [in Russian]
- Белобородов В.Б. Антибактериальная терапия инфекционных заболеваний в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Инфекции и антимикробная терапия. — 1999. — № 1. — С. 4–6. / Beloborodov V.B. Antibakterial'naya terapiya infektsionnykh zabolevanij v otdeleniyakh reanimatsii i intensivnoj terapii. Infektsii i antimikrobnaya terapiya 1999; 1: 4–6. [in Russian]
- Беляков В.Д., Колесов А.П. Госпитальная инфекция. М.: 2006. — 120 с. «Внутрибольничные инфекции»: Пер. с англ. Под ред. Р.П. Венцеля. Издание второе, переработанное и дополненное. М.: Медицина, 2004. — 840 с. / Belyakov V. D., Kolesov A. P. Gospital'naya infektsiya. M.: 2006; 120. «Vnutribol'nichnye infektsii»: Per. s angl. Pod. red. R. P. Ventselya. Izdanie vtoroe, pererabotannoe i dopolnennoe. M.: Meditsina, 2004; 840. [in Russian]

Staphylococcus spp. были чувствительны к карбапенемам (имипенему (68,6%), меропенему (62,8%)), цефалоспорином III поколения (цефтриаксону (68,6%), цефоперазону/сульбактаму (57,1%)), фторхинолонам (офлоксацину (65,7%), левофлоксацину (60%), ципрофлоксацину (57,1%), аминогликозидам (амикацину и гентамицину (по 51,4%)), ванкомицину, азлоциллину (по 57,1%), рифампицину, амоксициллину (по 51,4%). Отмечалась резистентность к цефоперазону.

Proteus vulgaris обладал чувствительностью к карбапенемам (меропенему (85,3%), имипенему (52,99)), фторхинолонам (ципрофлоксацину (64,7%)), левофлоксацину (58,9%)), цефалоспорином IV поколения (цефепиму (58,9%)).

Citrobacter spp. проявлял устойчивость к азлоциллину и цефоперазону (по 43,8% случаев), высокий уровень устойчивости к имипенему (62,5%), меропенему (53,1%).

E.coli была чувствительна к азлоциллину в 57,7% случаев; резистентность к гентамицину наблюдалась в 46,2%, амикацину — 30,8% случаев.

Streptococcus spp. были чувствительны к меропенему, ципрофлоксацину, офлоксацину, цефтриаксону, ванкомицину, амоксициллину (по 60%), левофлоксацину и амикацину (по 53,3%), проявляли высокую устойчивость к имипенему (в 53,3% случаях).

Выводы

- В спектре микроорганизмов, выделенных от больных, находящихся на лечении в ОРИТ различного профиля, определена ведущая роль *P. aeruginosa*, и *Proteus vulgaris*.
- Отмечалась разница микробного пейзажа в зависимости от профиля ОРИТ: в ОРИТ хирургического профиля чаще высевалась стафилококковая флора.
- Региональной особенностью микробного пейзажа в ОРИТ является преобладание в структуре патогенов синегнойной палочки.
- В целях профилактики ВБИ и повышения эффективности АБТ и их комбинаций в ОРИТ необходимо проводить тщательный микробиологический контроль.

- Белобородов В.Б. Проблема инфекций, связанных с катетеризацией. Антимикробная терапия тяжелых инфекций в стационаре. — 2003. — № 2. — С. 82–91. / Beloborodov V.B. Problema infektsij, svyazannykh s kateterizatsiej. Antimikrobnaya terapiya tyazhelykh infektsij v stacionare. — 2003. — № 2. — С. 82–91. [in Russian]
- Коршунова Г.С. О состоянии заболеваемости внутрибольничными инфекциями в Российской Федерации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2007. — № 10. — С. 4–5. / Korshunova G. S. O sostoyanii zabolevaemosti vnutribol'nichnymi infektsiyami v Rossijskoj Federatsii. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika 2007; 10: 4–5. [in Russian]
- Монисов А.А. и др. Состояние заболеваемости внутрибольничными инфекциями в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2000. — № 5. — С. 9–12. / Monisov A.A. i dr. Sostoyanie zabolevaemosti vnutribol'nichnymi infektsiyami v Rossijskoj Federatsii. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni 2000; 5: 9–12. [in Russian]
- Савченко С.М. Внутрибольничные инфекции — одна из острых проблем современного здравоохранения. Здравоохранение и мед. техника. — 2005. — № 2. — С. 20–22. / Savchenko S.M. Vnutribol'nichnye infektsii — odna iz ostrejsih problem sovremenno-

- go zdavookhraneniya. Zdravookhranenie i med. tekhnika. 2005; 2: 20–22. [in Russian]
8. Гельфанд Б.Р. и др. Нозокомиальная пневмония, связанная с ИВЛ у хирургических больных. М.: 2000. — 21 с. / Gelfand, B.R. i dr. Nozokomial'naya pnevmoniya, svyazannaya s IVL u khirurgicheskikh bol'nykh. M.: 2000; 21. [in Russian]
 9. Еришов А.Л. Этиологические и патогенетические особенности нозокомиальной пневмонии, связанной с ИВЛ. Анестезиология и реаниматология. — 2000. — № 3. — С. 69–72. / Ershov A.L. Etiologicheskie i patogeneticheskie osobennosti nozokomial'noj pnevmonii, svyazanno s IVL. Anesteziologiya i reanimatologiya 2000; 3: 69–72. [in Russian]
 10. Карабак В.И. Микробиологический мониторинг за возбудителями нозокомиальных инфекций (на примере отделений реанимации и интенсивной терапии). Инфекции и антимикробная терапия. — 2005. — Т. 6. — № 7. — С. 53–58. / Karabak V.I. Mikrobiologicheskij monitoring za vzbuditelyami nozokomial'nykh infektsij (na primere otdelenij reanimatsii i intensivnoj terapii). Infektsii i antimikrobnaya terapiya 2005; 6: 7: 53–58. [in Russian]
 11. Качанко Е.Ф. и др. Мониторинг антибиотикорезистентности *P.aeruginosa* в отделении интенсивной терапии и реанимации. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2003. — Т. 5. — С. 21–22. / Kachanko E.F. i dr. Monitoring antibiotikorezistentnosti *P.aeruginosa* v otdelenii intensivnoj terapii i reanimatsii. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2003; 5: 21–22. [in Russian]
 12. Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Инфекции в интенсивной терапии. 2-е изд. перераб. и доп. М.: Издательство «Бионика», 2003. — 208 с. / Sidorenko S.V., Yakovlev S.V. Infektsii v intensivnoj terapii. 2-e izd. pererab. i dop. M.: Izdatel'stvo «Bionika», 2003; 208. [in Russian]
 13. Подсвинова И. А., Алиева Е.В. Микробиологический мониторинг патогенов гнойно-воспалительных заболеваний в хирургических отделениях и отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара регионального уровня. Справочник заведующего КДЛ. — 2012. — № 8. — С. 15–17. / Podsvirova I. A., Alieva E.V. Mikrobiologicheskij monitoring patogenov gnojno-vospalitel'nykh zabolevanij v khirurgicheskikh otdeleniyakh i otdelenii reanimatsii i intensivnoj terapii mnogoprofil'nogo statsionara regional'nogo urovnya. Spravochnik zaveduyushchego KDL 2012; 8: 15–17. [in Russian]
 14. Синопальников А.И., Дмитриев Ю.К. Вентилятор-ассоциированная пневмония: критерии диагностики, прогноз, эмпирическая антибактериальная терапия. Российские медицинские вести. — 2000. — № 3. — С. 45–51. / Sinopal'nikov A.I., Dmitriev Yu.K. Ventilator-assotsirovannaya pnevmoniya: kriterii diagnostiki, prognoz, empiricheskaya antibakterial'naya terapiya. Rossijskie meditsinskie vesti 2000; 3: 45–51. [in Russian]
 15. Страчунский Л.С. и др. Рекомендации по оптимизации антимикробной химиотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными возбудителями в ОРИТ: Пособие для врачей. Смоленск: Боргес, 2002. — 128 с. / Strachunskij L.S. i dr. Rekomendatsii po optimizatsii antimikrobnaj khimioterapii nozokomial'nykh infektsij, vyzvannykh gramotritsatel'nymi vzbuditelyami v ORIT: Posobie dlya vrachej. Smolensk: Borges, 2002; 128 s. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Балоева Диана Ахмедовна — студентка 6 курса медицинского факультета ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Этезова Жулдуз Борисовна — студентка 6 курса медицинского факультета ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Камбачокова Зарета Анатольевна — д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Арамисова Рина Мухамедовна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии ФГБОУ ВО

«Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Пшукова Елена Мухадиновна — к. м. н., доцент кафедры нормальной и патологической анатомии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Гурижеева Мадина Валериановна — к. м. н., доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Габаева Мадина Магомедовна — к. м. н., доцент кафедры детских болезней, акушерства и гинекологии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик

Современное состояние антибиотикорезистентности оппортунистических патогенов и уровня потребления антибактериальных препаратов в акушерском стационаре федерального значения третьего уровня

Д. М. СЕРДЮКОВА, Н. Е. ШАБАНОВА, *Л. А. ЛЮБАСОВСКАЯ,
А. В. НИКОЛАЕВА, Р. Г. ШМАКОВ, А. В. СКОРОБОГАТЫЙ, Т. В. ПРИПУТНЕВИЧ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова», Москва

Contemporary State of Antibiotic Resistance in Opportunistic Pathogens and the Extent of Antibiotic Use in the Third-Level Federal Obstetric Hospital

D. M. SERDYUKOVA, N. E. SHABANOVA, *L. A. LYUBASOVSKAYA,
A. V. NIKOLAEVA, R. G. SHMAKOV, A. V. SKOROBOGATIY, T. V. PRIPUTNEVICH

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Увеличение частоты использования антибиотиков, особенно, их нерационального применения в качестве эмпирической терапии, привело к нарастанию устойчивости микроорганизмов и стало причиной значительного снижения эффективности проводимого лечения. В ходе исследования проведены ретроспективный фармакоэпидемиологический анализ потребления антимикробных препаратов и микробиологический мониторинг в акушерских отделениях ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России за 2014–2018 гг. Проведён сравнительный анализ показателей антибиотикопотребления до и после внедрения в Центре стратификации госпитализированных пациентов с инфекцией и с учётом риска выделения полирезистентных возбудителей. Для оценки динамики потребления антибиотиков использовали стандартизованную ATC/DDD методологию. Уровень антибиотикопотребления оценивали по показателю DDDs/100 койко-дней, общей DDDs, принятыми ВОЗ. В результате проведённого анализа потребления антибиотиков на фоне микробиологического мониторинга определены основные векторы эмпирической антибактериальной терапии в акушерском стационаре федерального значения 3 уровня. Широкое использование защищённых аминопенициллинов и тенденция к увеличению потребления может привести к снижению чувствительности к ним энтеробактерий — основных оппортунистических патогенов в акушерстве и гинекологии. Проведённое исследование показало, что чувствительность *E. coli* к бета-лактамам АБП остаётся достаточно высокой. Тем не менее, возрастающее потребление цефалоспоринов может спровоцировать «параллельный ущерб» и, как следствие, повышение уровня антибиотикорезистентности в лечебных учреждениях. Чувствительность к фторхинолонам штаммов энтеробактерий сохраняется на высоком уровне, поэтому эти препараты должны быть АБП второй линии при неэффективности стартовой терапии послеродовых инфекционных осложнений. Однако для выбора антибактериальных препаратов с целью периперационной профилактики и стартовой терапии целесообразно использовать защищённые аминопенициллины. Также исследование продемонстрировало, что внедрение стратификации госпитализированных пациентов с инфекцией с учётом риска выделения полирезистентных возбудителей в Центре снизило потребление антибиотиков. Используя DDD-методологию, нам удалось определить рациональные объёмы антибиотикопотребления в отделениях акушерского профиля: не превышающие 8–10 DDD/100КД для акушерских физиологических отделений и 15–20 DDD/100КД — для отделений патологии беременных. Таким образом, регулярное проведение анализа антибиотикопотребления и микробиологического мониторинга является основой стратегии борьбы с антибиотикорезистентностью как на местном, так и на федеральном уровне.

Ключевые слова: антибиотикотерапия, фармакоэпидемиологический анализ, ATC/DDD-методология, антибиотикопотребление, микробиологический мониторинг, акушерство, антибиотикорезистентность, стратегия контроля антибиотикорезистентности.

An increase in the frequency of antibiotic consumption, especially their irrational use as empirical therapy, led to an increase in the resistance of microorganisms and caused a significant decrease in the effectiveness of antibiotic treatment. In the course of the study, a retrospective pharmacoepidemiologic analysis of the consumption of antimicrobial agents and microbiological monitoring were conducted in obstetric departments of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov for the 2014–2018. A comparative analysis of antibiotic consumption indicators was carried out before and after the implementation of Risk Stratification Approach (patients with infection are stratified according to the risk of poly-resistant pathogens). Standardized ATC/DDD methodology was used to assess the dynamics of antibiotic consumption.

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

tion. Antibiotic levels were assessed by the rate of DDD/100 bed days, with total DDD accepted by WHO. As a result of pharmacoepidemiologic analysis and microbiological monitoring, the main vectors of empirical antibiotic therapy in an obstetric hospital of level 3 federal significance were determined. The widespread use of protected aminopenicillins and the tendency to increase their consumption can lead to a decrease in the sensitivity of enterobacteria — the main opportunistic pathogens in obstetrics and gynecology — to them. The study showed that the sensitivity of *E.coli* to beta-lactam antibiotics remains quite high. Nevertheless, increasing consumption of cephalosporins can provoke «parallel damage» and, as a result, increase the level of antibiotic resistance in medical institutions. The sensitivity of Enterobacterial strains to fluoroquinolones remains at a high level, so these drugs should be classified as second-line antibiotics and used in case if the initial treatment of postpartum infectious complications proves to be ineffective. Nevertheless, it is advisable to use protected aminopenicillins for the purpose of perioperative prophylaxis and initial therapy. The study also demonstrated that the introduction of stratification of hospitalized patients with infection reduced the consumption of antibiotics, taking into account the risk of multiresistant pathogens release in the Center. Using the DDD methodology, the authors were able to determine the rational volumes of antibiotic consumption in obstetric departments: not exceeding 8–10 DDD/100 bed days for Department of Physiology and not more than 15–20 DDD/100 bed days for Department of Pregnancy Pathology. Reliable data on antimicrobial consumption and microbiological monitoring should form a basis for national and local policies devised to reduce the resistance of microorganisms to antibiotics.

Keywords: antibacterial therapy, pharmacoepidemiologic analysis, ATC/DDD methodology, antibiotic consumption, microbiological monitoring, obstetrics, antibiotic resistance, Antimicrobial Stewardship Programs (ASPs).

Введение

Во всем мире значимыми причинами заболеваемости и смертности остаются инфекционные заболевания, даже несмотря на большие достижения в области разработки новых противомикробных средств и антимикробной терапии в целом [1, 2].

В настоящее время в России применяется тридцать различных групп антибактериальных средств, а число препаратов составляет около двухсот без учёта генериков. По данным литературы, в США одними из часто назначаемых препаратов беременным женщинам являются антибиотики и в среднем из пяти применяемых средств — три приходится на долю антимикробных. В Дании, по результатам проведённого популяционного когортного исследования с 2000 по 2010 гг., выявлено использование антибиотиков в 33,4% случаев среди всех родоразрешений и отмечался рост с 28,4 до 37,0%, соответственно. Показано, что во время беременности у 20,8% женщин применялся минимум один антибактериальный препарат, наиболее часто используются препараты из группы бета-лактамов [3].

В структуре высокотехнологичной медицинской помощи охрана здоровья матери и ребёнка является одним из приоритетных направлений. Согласно Государственному докладу «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» в течение последних 10 лет объектами риска в отношении инфекций наравне с хирургическими стационарами продолжают оставаться родовспомогательные учреждения — от 20 до 35% в общей структуре инфекционной заболеваемости [4].

Развитие перинатальной медицины связано с повышенным риском и увеличением частоты инфекционных осложнений из-за прогрессивного роста числа беременностей с высокой вероятностью преждевременных родов после программ вспомогательных репродуктивных технологий

(ВРТ), осложнений послеродового периода, а также числа новорождённых детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении и тяжёлыми врождёнными пороками развития. Использование антибактериальных препаратов (АБП) является одним из важных компонентов проведения профилактики и терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у женщин и новорождённых. Эффективность проводимого лечения, благоприятные акушерские и неонатальные исходы определяют обоснованное, своевременное и рациональное назначение антимикробных средств [5, 6].

Как система контроля за потреблением антибиотиков и антибиотикорезистентностью в странах Западной Европы и Северной Америки в последнее десятилетие активно развивается направление «Antimicrobial Stewardship Programs (ASPs)», представляющее собой процесс формирования государственных программ сохранения активности антимикробных препаратов и оптимизации их применения на различных уровнях здравоохранения — от принятия клинического решения отдельным специалистом до формирования системы управления потреблением АБП на основании чётких алгоритмов диагностики, критериев назначения и отмены в масштабах страны. В рамках ASPs проводится создание клинических протоколов и алгоритмов ведения пациентов, утверждённых на государственном уровне, подразумевающих обязательное взаимодействие различных медицинских служб в рамках преодоления антибиотикорезистентности. Данная система позволяет стандартизовать подходы к рациональной антимикробной терапии у пациентов, но не решает проблемы персонализированного подхода к пациенту с учётом фармакокинетических параметров. В нашей стране подобное направление деятельности на государственном уровне находится в стадии формирования. В РФ с участием Российских медицинских

сообществ разработан аналоговый ASPs комплекс мероприятий по рационализации использования антимикробных препаратов и сдерживанию антибиотикорезистентности в стационарах — программа «Стратегия контроля антимикробной терапии (СКАТ)» [7]. Данная стратегия позволяет врачам принять решение о рациональной эмпирической антимикробной терапии в условиях отсутствия данных о «фармако-микробиологическом профиле» пациента, используя в основном анамнестические данные, которые дают возможность стратифицировать пациентов по факторам риска наличия резистентных или полирезистентных микроорганизмов в качестве возбудителей инфекций. За период существования программы СКАТ накоплен большой опыт во взрослых стационарах, в основном хирургического профиля и отделений анестезиологии и реанимации. Внедрение программы СКАТ в перинатальных центрах в настоящий момент недостаточно. Это связано с несколькими причинами — считается, что в акушерстве проблема резистентности к АБП менее значима, чем в хирургии и общей реаниматологии, также существуют определённые проблемы в методологии учёта потребления АБП у детей. Однако вышеупомянутая СКАТ-стратификация пациентов, позволяющая врачам принять решение о рациональной эмпирической антимикробной терапии, стала возможна и в родовспомогательных учреждениях, особенно, после формирования трёхуровневой системы структуры родовспоможения. Такое изменение структуры родовспоможения привело к тому, что родовспомогательные учреждения третьего уровня отделения патологии беременности сосредотачивают пациентов III типа, ОРИТ перинатальных центров — II–IV типа, а основной контингент женщин, находящихся в физиологических акушерских отделениях — II типа (согласно СКАТ-стратификации). По данным, полученным в рамках Пилотного проекта «Изучение распределения и интенсивности циркуляции штаммов возбудителей (в т.ч. резистентных) инфекционных заболеваний среди беременных, родильниц и новорождённых в регионах Российской Федерации» в 2017 г. выявлено наличие проблем антибиотикорезистентности, аналогичных мировым и Российским тенденциям стационаров хирургического профиля — появление инфекций, вызванных полирезистентными и панрезистентными вариантами условно-патогенных микроорганизмов из группы ESCAPE-патогенов (УПМ) [8].

Настоящее исследование представляет анализ уровня потребления АБП за пять лет в акушерских отделениях (физиологии и патологии) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (далее — Центр), а также видового состава и профиля резистентности наиболее значимых групп УПМ к антимикробным препаратам.

Цель исследования — провести сравнительный фармакоэпидемиологический анализ уровня потребления антимикробных препаратов в акушерских отделениях Центра с использованием DDD-методологии и оценить видовой состав условно-патогенных микроорганизмов, выделяемых у беременных, рожениц и родильниц.

Материал и методы

Анализ потребления антимикробных препаратов в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (далее — Центр) проводили за 2014–2018 гг. Источником информации для данного исследования была внутрибольничная система учёта движения лекарственных средств, осуществляемая на базе конфигурации программного продукта 1с «Медицина. Больничная аптека, редакция 1.1». Фармакоэпидемиологический анализ включал использование DDD-методологии (Defined Daily Dose — расчётная средняя поддерживающая суточная доза), рекомендованной ВОЗ для проведения исследований по изучению использования лекарственных средств, с включением данных за 2014–2018 гг. [9].

В качестве единицы измерения использовалось количество граммов активного вещества, с учётом пути введения препарата (*per os*, парентерально). В исследовании проводили расчёт потребления каждого антибактериального препарата по МНН за 5 лет. Кроме того, для оценки динамики потребления антибактериальных препаратов измеряли число установленных дневных доз на 100 койко-дней (DDDs/100 койко-дней, показатель рекомендованный ВОЗ).

Структура акушерских отделений представлена двумя отделениями физиологии (№1 и №2) и двумя отделениями патологии беременных (№1 и №2). Акушерские физиологические отделения по контингенту пациенток, относящихся преимущественно ко II типу по классификации СКАТ, не имеют особых различий. Пациентки, относящиеся к III типу, находятся в отделениях патологии беременности, а в послеродовом периоде переводятся в физиологические отделения. Отделения патологии беременности Центра имеют различия в контингенте больных — отделение патологии №1 сосредотачивает беременных женщин, имеющих осложнённый соматический анамнез и тяжёлую экстрагенитальную патологию (хронические воспалительные и/или аутоиммунные заболевания, трансплантированные органы); отделение патологии №2 — пациенток с риском невынашивания беременности, после неоднократных процедур ЭКО, с многочисленными потерями беременности, с истмико-цервикальной недостаточностью. В патологии беременности проводится скрининг на носительство *Streptococcus agalactiae* (СГВ) путём взятия вагино-ректальных мазков в 35–37 нед. беременности, в отделениях физиологии основным контингентом являются родильницы, поэтому скрининг на СГВ им не проводится.

Для определения общих тенденций видового состава УПМ, выделяемых от беременных и родильниц в работе представлены данные микробиологических исследований за 2018 г. Видовую идентификацию микроорганизмов проводили методом MALDI-TOF-MS анализа. Чувствительность к антимикробным препаратам определяли преимущественно диско-диффузионным методом (OXOID, Великобритания), на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek2Compact (BioMerieux, США) и с помощью E-тестов (Liophilchem, Италия).

Результаты исследования

В 2018 г. в акушерском стационаре обследовано 1610 женщин, из них в отделениях физиологии — 21% ($n=340$) и 79% — в отделениях патологии беременности ($n=1270$), т. е. в 3,7 раза чаще. В отделениях патологии беременности треть всех исследо-

Таблица 1. Количество образцов биологического материала в отделениях акушерского профиля в 2018 г.

Биологический материал	Количество образцов в акушерских физиологических отделениях (абс./%)	Количество образцов в отделениях патологии беременных (абс./%)
Вагино-ректальный мазок на СГВ	—	390/30,7
Отделяемое влагалища	202/60	333/26,2
Отделяемое цервикального канала	197/58,3	362/28,50
Моча	17/5,0	157/12,4
Кровь	18/4,7	6/0,5
Околоплодные воды и амниотическая жидкость	4/1,2	20/1,6
Отделяемое послеоперационного рубца	2/0,6	—
Полость матки	1/0,3	2/0,02
Общее число пациенток	340	1270

Таблица 2. Частота выделения микроорганизмов в отделениях акушерского профиля в 2018 г.

Вид микроорганизма	Акушерские физиологические отделения (%) <i>n</i> =1178	Отделения патологии беременных (%) <i>n</i> =2082
<i>Lactobacillus</i> spp.	25,2	31,0
Коагулазонегативные стафилококки (CoNS)	21,0	21,0
<i>E.faecalis</i>	20,0	15,0
<i>E.coli</i>	11,0	8,7
<i>C.albicans</i>	7,6	4,9
Другие энтеробактерии	3,4	6,6
<i>S.agalactiae</i>	1,9	4,6
<i>S.aureus</i>	1,6	0,9

ваний (30,7%) приходится на скрининг СГВ (табл. 1). В целом, при микробиологическом обследовании беременных, рожениц и родильниц преобладает биологический материал из влагалища (60 и 58,3%) и цервикального канала (26,8 и 28,5%). Бактериологическое исследование крови на стерильность в акушерских физиологических и отделениях патологии беременных составляет 4,7% (*n*=18) и 0,5% (*n*=6), соответственно (см. табл. 1).

Частота выделения *Staphylococcus aureus* составила 1,6% (*n*=19) и 0,9% (*n*=19), соответственно, метициллинорезистентных штаммов не обнаружено (табл. 2).

В общей видовой структуре частота выделения *S.agalactiae* в отделениях патологии превышала таковую в отделениях физиологии в 2,5 раза — 4,6% (*n*=96) и 1,9% (*n*=22), соответственно, что связано с увеличением вероятности обнаружения СГВ при скрининге путём взятия вагино-ректальных мазков. Так, частота выделения СГВ при исследовании вагинального отделяемого или из цервикального канала составила 5,3 на 100 выполненных посевов, при скрининге на СГВ частота выделения увеличивается в 2,5 раза — до 13 на 100 проведённых исследований.

Чувствительность *S.agalactiae* к клиндамицину (препарату второй линии при аллергической реакции на пенициллины) составила 86,4% в отделениях физиологии и 75% в отделениях патологии беременных.

Частота выделения *Enterococcus faecalis* составила 20,2% в физиологических отделениях (*n*=238) и 15% (*n*=310) — в патологии беременности. Чувствительность к амипициллину, ванкомицину и нитрофурантоину сохраняется у 100% выделенных штаммов; к левофлоксацину у 97,7 и

96,7%, а к гентамицину — 84,4 и 77%, соответственно. *Enterococcus faecium* среди выделенных энтерококков не обнаружено.

Частота выделения *Escherichia coli* составила 11% (*n*=129) и 8,7% (*n*=181), соответственно (см. табл. 2).

Отмечен критический уровень чувствительности *E.coli* к защищённым аминопеницилинам в отделениях патологии беременности, которая составила 86,9% (113/127), в то время как, в отделениях физиологии беременности чувствительность штаммов составила 93,5% (119/123). Более низкая чувствительность выделенных штаммов показана к цефалоспорином III–IV поколения — 88% (физиологические отделения) и 85,2% (отделения патологии). На высоком уровне сохраняется чувствительность к гентамицину — 95,9% (117/122) — 93,5% (116/124) и к фторхинолонам — 91,7% (110/120) и 92,1% (116/124) (рис. 1).

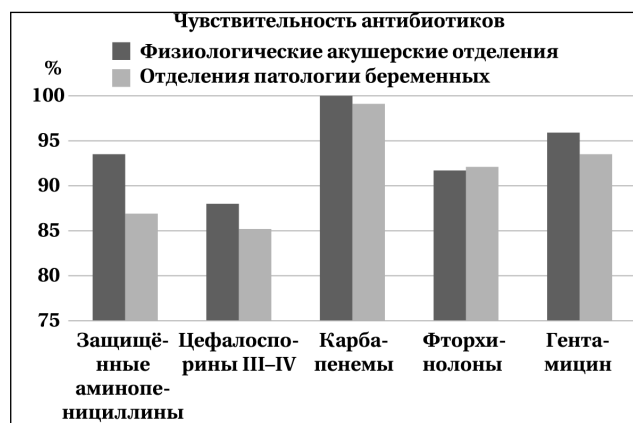


Рис. 1. Чувствительность штаммов *E.coli* в отделениях акушерского профиля в 2018 г.

Частота выделения энтеробактерий других видов (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *E.aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* и др.) сопоставима в отделениях физиологии и патологии беременности и составляет 3,4% ($n=41$) и 3,8% ($n=81$), что в 2,5 раза ниже, чем частота выделения *E.coli*. Доля чувствительных штаммов у пациенток, находящихся на лечении в патологии беременности была значительно ниже по сравнению со штаммами, выделенными от женщин физиологических отделений: к защищённым аминопенициллинам — на 30% (94,1 vs 64,1%), к цефалоспорином III–IV поколения — на 9% (94 vs 85%). Как и у *E.coli*, популяцию других видов энтеробактерий характеризует высокий процент чувствительности к фторхинолонам — 94% (в отделениях физиологии) и 97% (в отделениях патологии) (рис. 2).

Среди женщин в послеродовом периоде, у которых проведено микробиологическое исследование, признаки системного воспалительного ответа (СВО) отмечали у 67 пациенток, из них у 18 (27%) на фоне признаков СВО выделена положительная гемокультура: преобладающими видами УПМ были *E.coli* и *E.faecalis*, а также *K.pneumoniae* и другие энтеробактерии. Среди пациентов с СВО при микробиологическом исследовании полости послеродовой матки преобладали также *E.coli* (29%), *K.pneumoniae* и другие энтеробактерии (10,5%), *E.faecalis* (16%), облигатные анаэробы и *G.vaginalis* (16%), стрептококки (13,5%), дрожжевые грибы (1%), другие УПМ — лактобациллы и CoNS (14%) (табл. 3). Следует отметить, что самой частой ассоциацией при СВО в крови, полости матки и цервикальном канале была *E.coli* и *E.faecalis*.

Устойчивость выделенных штаммов энтеробактерий к АБП оказалась значительно выше, чем в общей популяции выделенных УПМ: из шести штаммов *E.coli*, выделенных из крови в чистой культуре, пять были продуцентами БЛРС и лишь один сохранял чувствительность к защищённым аминопенициллинам, при этом все оставались чувствительны к фторхинолонам. Все *K.pneumoniae*, выделенные из крови, полости послеродовой матки и цервикального канала при наличии СВО были продуцентами БЛРС.

Чувствительность к карбапенемам *E.coli* до сих пор остается на высоком уровне в акушерских

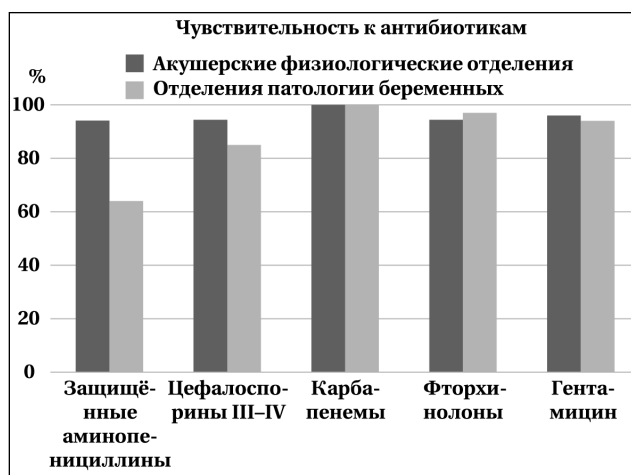


Рис. 2. Чувствительность штаммов других энтеробактерий в отделениях акушерского профиля в 2018 г.

физиологических отделений и достигает 100%, в патологии — 99,1%, поэтому в акушерской клинической практике при экспресс-диагностике методом ПЦР генов резистентности у энтеробактерий наряду с генами карбапенемаз актуальна детекция генов бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Продуцентов карбапенемаз среди других энтеробактерий также не обнаружено (см. рис. 1, 2).

Учитывая вышеизложенное, при необходимости эскалации антимикробной терапии эмпирическим путём в случае клинической неэффективности стартовой терапии целесообразным является добавление к защищённым аминопенициллинам и цефалоспорином гентамицина, или замена стартовой схемы на монотерапию фторхинолонами. Комбинация защищённого аминопенициллина с аминогликозидом II поколения является актуальной для стартовой терапии раннего неонатального сепсиса у новорождённых, рождённых от матерей, отнесённых к III типу по стратификации СКАТ.

Анализ уровня потребления АБП показал относительно невысокие цифры потребления, с доминирующим показателем в отделениях патологии беременности: 14 vs 9 DDD/100 КД для амоксициллина+клавулановая кислота и 6 vs 0,5 DDD/100 КД для цефалоспоринов III поколения. При этом нами отмечено, что даже при невысоком уровне потребления увеличение использова-

Таблица 3. Видовой состав УПМ, выделенных у женщин в послеродовом периоде с признаками СВО

Микроорганизмы	Из полости послеродовой матки, %	Из крови, %
<i>E.coli</i>	29	33
<i>K.pneumoniae</i> и другие энтеробактерии	10,5	19
<i>E.faecalis</i>	16	28,5
<i>S.aureus</i>	—	5
<i>S.agalactiae</i> и другие стрептококки	13,5	5
Облигатные анаэробы и <i>G.vaginalis</i>	16	—
Дрожжевые грибы	1	—
Лактобациллы, CoNS и другие УПМ	14	9,5

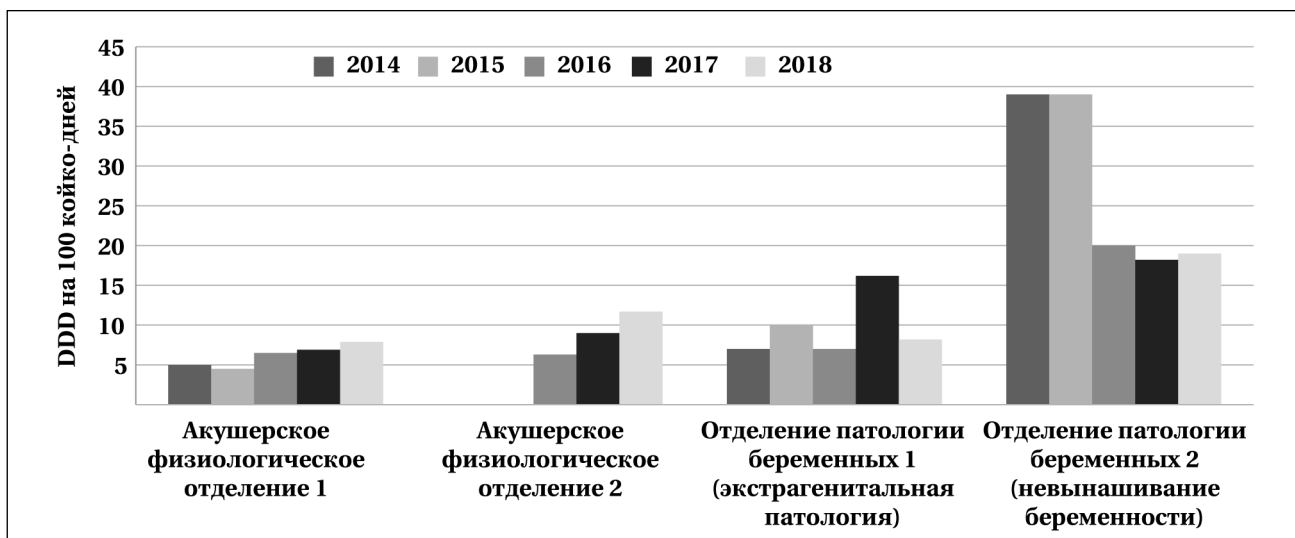


Рис. 3. Сравнение суммарного потребления АБП в акушерских отделениях Центра 2014–2018 гг. (DDD на 100 койко-дней)

ния АБП на 5–6 DDD/100 КД приводит к большей распространённости резистентных штаммов энтеробактерий минимум на 5% для *E.coli* и на 30% для других энтеробактерий.

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii* и другие неферментирующие грамотрицательные бактерии выделяли у единичных пациенток и штаммы отличались высокой чувствительностью к соответствующему набору антибиотиков.

Общий уровень потребления АБП в отделениях патологии беременности значительно превосходит таковой в отделениях физиологии — 8,2–19 vs 7,9–11,7 DDD/100КД (рис. 3). При этом за 2014 г. между двумя отделениями патологии беременности отмечены значительные отличия в уровне по-

требления АБП. В отделении патологии беременности №2 он достигал 40 DDD/100 КД, в то время как в отделении патологии №1 максимальные цифры DDD не превышали 16 на 100 КД. Внедрение принципов СКАТ позволило снизить высокий уровень потребления АБП отделением №2 в 2 раза с 40 до 19 DDD/100КД.

В отделениях физиологии беременности уровень потребления АБП минимально — 4,5, максимально — 11,7 DDD/100КД.

В структуре групп АБП, наиболее широко применяемых в акушерских отделениях, преобладают защищённые аминопенициллины, значительно меньше — цефалоспорины I–II поколения и метронидазол (рис. 4). Одновременное

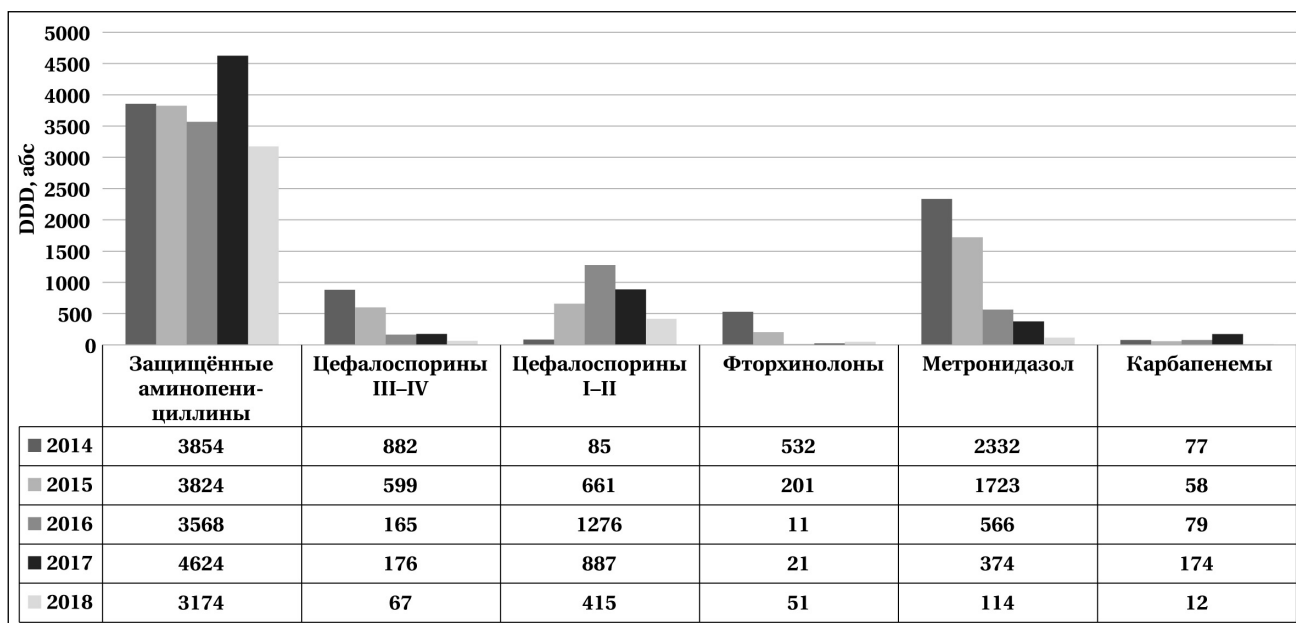


Рис. 4. Структура потребления АБП в акушерских отделениях Центра 2014–2018 гг.

снижение использования цефалоспоринов и метронидазола связано с комбинированным их назначением при проведении антибактериальной терапии. Для акушерско-гинекологической практики защищённые аминопенициллины являются приоритетными препаратами. Необходимо помнить, что цефалоспорины активны в отношении многих грамположительных кокков, но не в отношении *E.faecalis*, который является наиболее часто выделяемым микроорганизмом. В то же время, монотерапия цефалоспоринами неэффективна в отношении анаэробных бактерий и это имеет особое значение для акушерско-гинекологической практики, поскольку часто бактериальный вагиноз является ключевым фоновым компонентом восходящего инфицирования матки и амниотической полости. В связи с этим, профилактика и лечение цефалоспоринами в акушерстве требует обязательного дополнения метронидазолом. Защищённые аминопенициллины по своему спектру активны в отношении основных микроорганизмов, вызывающих инфекционно-воспалительные процессы у женщин в течение и после беременности (*E.coli*, *E.faecalis*, *S.aureus*, *S.agalactiae*, анаэробы), их необходимо беречь и рационально использовать, чтобы сохранялась высокая чувствительность бактерий к данной группе препаратов.

Помимо энтерококков и энтеробактерий видовая структура наиболее часто выделяемых микроорганизмов, наряду с доминирующими *Lactobacillus* spp. — 25,2% ($n=297$) и 31,2% ($n=649$), представлена коагулазонегативными стафилококками (CoNS) — 21% ($n=247$ и 437, соответственно). Среди CoNS большинство выделенных изолятов принадлежало к виду *S.epidermidis* 13,2% ($n=155$) в физиологических отделениях и 16,0% ($n=333$) в отделениях патологии беременности, *S.haemolyticus* 7,8% ($n=92$) и 3,0% ($n=62$), соответственно, метициллинорезистентные штаммы в общей популяции CoNS составили 3% (9/314). Частота выделения дрожжевых грибов (*C.albicans*) составила — 7,6% ($n=90$) и 4,9% ($n=103$). Среди выделенных видов дрожжевых грибов в акушерских физиологических ($n=74$) и отделениях патологии беременных ($n=111$) абсолютно преобладал вид *C.albicans* — 94,6 и 92,8%, соответственно. Другие виды из группы дрожжевых грибов *Candida non-albicans* представлены: *C.glabrata* ($n=3$), *C.krusei* ($n=2$), *C.glabrata* ($n=4$), *C.parapsilosis* ($n=1$), *C.tropicalis* ($n=1$).

Таким образом, несмотря на преобладание в видовом спектре выделяемых УПМ CoNS и *E.faecalis*, при развитии инфекционного процесса, преобладают энтеробактерии — *E.coli*, *K.pneumoniae* — продуценты БЛРС и устойчивые к защищённым аминопенициллинам (до 75–100% штаммов). Отмечен критический уровень чувст-

вительности энтеробактерий к защищённым аминопенициллинам и цефалоспоринам III–IV поколений — до 64 и 85%, соответственно. Анализ потребления АБП показал, что даже при невысоком уровне потребления увеличение использования АБП на 5–6 DDD/100 КД приводит к большей распространённости резистентных штаммов энтеробактерий минимум на 5% для *E.coli* и на 30% для других энтеробактерий. Крайне высока актуальность ограничения необоснованного избыточного использования АБП не более 10 DDD/100 КД для защищённых аминопенициллина и не более 5 DDD/100 КД для цефалоспоринов III–IV в акушерской практике для уменьшения темпов снижения чувствительности к ним энтеробактерий — основных оппортунистических патогенов акушерства и гинекологии.

При неэффективности стартовой антимикробной терапии цефалоспоринами или защищёнными аминопенициллинами послеродовых инфекционных осложнений целесообразным является добавление гентамицина или замена на монотерапию фторхинолонами. Чувствительность к фторхинолонам штаммов энтеробактерий сохраняется на высоком уровне, поэтому эти препараты должны быть АБП второй линии. Комбинация защищённых аминопенициллинов с аминогликозидами II поколения является также актуальной для стартовой терапии раннего неонатального сепсиса у новорождённых, рождённых от матерей, отнесённых к III типу по стратификации СКАТ.

Обсуждение

Вклад АБП в повышение качества оказания медицинской помощи невозможно переоценить. Однако увеличение частоты использования антибиотиков, особенно нерациональное применение, привело к нарастанию устойчивости микроорганизмов и стало причиной значительного снижения эффективности проводимой терапии.

По данным неинтервенционного ретроспективного исследования в Санкт-Петербурге, опубликованного в 2017 г., в лечебных учреждениях у беременных женщин и родильниц из цервикального канала, полости матки и кала чаще всего выделялись следующие возбудители: *E.coli* (26,8%), *S.epidermidis* (23,6%), *E.faecalis* (13,8%), *Streptococcus* spp. (8,9%). При этом чувствительность *E.coli* была высока ко всем АБП, кроме ампициллина, и составляла: 66,7% — к ампициллину; 85,7% — к гентамицину; 87,5% — к нитрофурантоину; 90,9% — к цефуроксиму; 91,3% — к ко-тримоксазолу [10].

В качестве профилактики и лечения доказанной инфекции у беременных, родильниц и рожениц в стационарах Санкт-Петербурга использовались цефазолин и/или цефтриаксон, метронидазол. В нашем Центре, учитывая полученные данные, наиболее часто обнаруживали CoNS, боль-

шинство из которых метициллиночувствительные, и *E.faecalis* с чувствительностью к ампициллину 100%. Однако в этиологической структуре инфекций у родильниц и ранних (врождённых) неонатальных инфекций CoNS не играют значимой роли, а *E.faecalis* может стать причиной аэробного вагинита и послеродового сепсиса, как правило, в ассоциации с *E.coli* [8]. Наибольшую значимость как, по данным нашего исследования, так и, по данным коллектива авторов из трёх стационаров г. Москвы, представляют энтеробактерии и стрептококки. По их данным о состоянии резистентности и составе возбудителей инфекций мочевых путей у 104 беременных женщин преобладали *E.coli* — 47,3%, *E.faecalis* — 35,14%, *K.pneumoniae* — 12,16% и *Streptococcus* spp. — 1,35%. Чувствительность *E.coli* к ампициллину составляла 36,4%, амоксициллину/клавулановой кислоте — 76,8%, гентамицину — 81,3%, цефалоспорином III поколения — 75,7% [11]. *S.agalactiae* является значимым возбудителем аэробных вагинитов у женщин, хронических эндометритов и бесплодия, восходящего инфицирования плода, послеродовых инфекционных осложнений и ранних неонатальных инфекций [8]. Результаты нашего исследования показали, что проведение вагино-ректального скрининга в 35–37 нед. беременности повышает частоту выделения СГВ в 2,5 раза по сравнению с посевом из отделяемого влагалища и цервикального канала. В связи с этим, микробиологическое исследование из половых органов у беременных женщин на поздних сроках целесообразно дополнять вагино-ректальной пробой.

Одним из последних проведённых многоцентровых исследований по антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России был «ДАРМИС-2018». По полученным результатам в целом показатели резистентности возбудителей инфекций мочевых путей у беременных женщин ниже, чем в общей популяции взрослых. Удельный вес резистентных штаммов *E.coli* к АБП составил: к ампициллину — 42,3%, к амоксициллину+клавулановой кислоте — 32,3%, к цефалоспорином — менее 10% и к ципрофлоксацину — 20%. По нашим данным чувствительность *E.coli*, выделяемой у беременных женщин, к фтор-

хинолонам была близка к 100%. По частоте БЛРС продуцентов изолятов *E.coli* у беременных произошло снижение по сравнению с предыдущим исследованием «ДАРМИС» с 16,0 до 8,6% [12].

Учитывая результаты проведённых исследований, можно сделать вывод, что в акушерских стационарах сохраняется чувствительность к основным классам антибактериальных препаратов, применяемых у беременных, родильниц и рожениц. Однако при выборе антибактериальных препаратов с целью периоперационной профилактики и стартовой терапии целесообразно использовать защищённые аминопенициллины.

Мы считаем, что при расчёте суточных доз в отделениях акушерского профиля рациональным будет уровень потребления, не превышающий 8–10 DDD/100КД для акушерских физиологических отделений и 15–20 DDD/100КД — для отделений патологии беременных.

Ещё одним важным аспектом в становлении и развитии программы СКАТ в стационарах в том числе акушерского профиля, является обучение лечащих врачей с проведением лекций, семинаров, преподнесение информации должно быть с учётом исходного уровня знаний, на рабочем месте и с разбором клинических случаев [13]. Необходимо внедрять в перинатальных центрах стратификацию пациентов с инфекцией по риску возникновения резистентной микрофлоры, разработать факторы риска и типы пациентов для неонатологии.

Работа выполнена в рамках соглашения №05.604.21.0241 «Разработка технологии персонализированного лечения матерей и новорождённых с инфекционно-воспалительными заболеваниями, вызванными мультирезистентными штаммами микроорганизмов, на основании генотипирования возбудителей и терапевтического лекарственного мониторинга антимикробных препаратов» (мероприятие 1,2, очередь 1) Министерства науки и высшего образования РФ Программа: «Исследование и разработка по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

Уникальный Идентификатор проекта RFME-FI60419X0241.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савинова Т.А., Сидоренко С.В., Буданов С.В., Грудина С.А. Динамика распределения резистентности к бета-лактамам у *Streptococcus pneumoniae* и её клиническое значение. Антибиотики и химиотер. — 2010. — Т. 55. — № 1–2. — С. 12–20. / Savinova T.A., Sidorenko S.V., Budanov S.V., Grudina S.A. Dinamika raspredeleniya rezistentnosti k betalaktamam u *Streptococcus pneumoniae* i ee klinicheskoe znachenie. Antibiotiki i himioter 2010; 55 (1–2): 12–20. [in Russian]
2. Сидоренко С.В., Резван С.П., Еремина Л.В. и др. Этиология тяжёлых госпитальных инфекций в отделениях интенсивной терапии и антибиотикорезистентности возбудителей. Антибиотики и химиотер. — 2005. — Т. 50. — № 2–3. — С. 33–41. / Sidorenko S.V., Rezvan S.P., Eremina L.V. i dr. Jetiologija tjazhelyh hospital'nyh infekcij v otdelenijah intensivnoj terapii i antibiotikorezistentnosti возбуdivitelej. Antibiotiki i himioter 2005; 50 (2–3): 33–41. [in Russian]
3. De Jonge L., Bos H. J., van Langen I. M. et al. Antibiotics prescribed before, during and after pregnancy in the Netherlands: a drug utilization study. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2014; 23: 60–68.
4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. — 254 с. / O sostojanii sanitarno-jepidemiologicheskogo blagopoluchija naselenija v Rossijskoj Federacii v 2018 godu: Gosudarstvennyj doklad. M.: Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka, 2019; 254. [in Russian]
5. Балушкина А.А., Тютюнник В.Л. Основные принципы антибактериальной терапии в акушерской практике. Рус. мед. журн. (Акушерство и гинекология). — 2014. — № 19. — С. 1425–1427. / Balushkina A.A., Tjutjunnik V.L. Osnovnye principy antibakterial'noj terapii v akusherskoj praktike. Rus Med Zhurn. (Akusherstvo i ginekologija) 2014; 19: 1425–1427. [in Russian]

6. Боронина Л.Г., Блинова С.М., Саматова Е.В., Жилин А.В. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность основных возбудителей гнойно-септических заболеваний родильниц и новорожденных. Рус. мед. журн. — 2016. — № 5. — С. 336–339. / *Boronina L.G., Blinova S.M., Samatova E.V., Zhilin A.V. Etiologicheskaja struktura i antibiotikorezistentnost' osnovnyh vozбудitelej gnojno-septicheskikh zabolevanij rodil'nic i novorozhdennyh. Rus Med Zhurn 2016; 5: 336–339. [in Russian]*
7. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации. Под ред. С. В. Яковлева, Н. И. Брико, С. В. Сидоренко, Д. Н. Проценко. М.: Издательство «Перо», 2018. — 156 с. / *Programma SKAT (Strategija Kontrolja Antimikrobnaj Terapii) pri okazanii stacionarnoj medicinskoj pomoshhi: Rossijskie klinicheskie rekomendacii. Pod red. S. V. Jakovleva, N. I. Briko, S. V. Sidorenko, D. N. Procenko. M.: Izdatel'stvo «Pero», 2018; 156. [in Russian]*
8. Припутневич Т.В., Любасовская Л.А., Дубоделов Д.В., Гордеев А.Б., Мелкумян А.Р., Трофимов Д.Ю. и др. Результаты пилотного проекта «Изучение распределения и интенсивности циркуляции штаммов возбудителей (в т.ч. резистентных) инфекционных заболеваний среди беременных, родильниц и новорожденных в регионах Российской Федерации» выявлено наличие проблем антибиотикорезистентности, аналогичных мировым и Российским тенденциям стационаров хирургического профиля». Акушерство и гинекология. — 2018. — № 12. — приложение 2. — С. 3–36. / *Priputnevich T.V., Ljubasovskaja L.A., Dubodelov D.V., Gordeev A.B., Melkumjan A.R., Trofimov D.Ju. i soavt. Rezul'taty pilotnogo projekta «Izuchenie raspredelenija i intensivnosti cirkuljacii shtammov vozбудitelej (v t.ch. rezistentnyh) infekcionnyh zabolevanij sredi beremennyh, rodil'nic i novorozhdennyh v regionah Rossijskoj Federacii» vyjavleno nalichie problem antibiotikorezistentnosti, analogichnyh mirovym i Rossijskim tendencijam stacionarov hirurgicheskogo profilja». Akusherstvo i ginekologija 2018; 12: prilozhenie 2: 3–36. [in Russian]*
9. World Health Organization Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. ATC/DDD Index 2017 [updated 2016 Dec 19; cited 2016 Dec 21]. Available from: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/.
10. Колбин А.С., Сидоренко С.В., Загородникова К.А., Лобзин Ю.В., Иванов Д.О., Шабалов Н.П. и соавт. Фармакоэпидемиология противомикробных средств у беременных женщин и родильниц. Данные неинтервенционного ретроспективного исследования. Клин микробиол и антимикроб химиотер. — 2017. — Т. 19. — № 11. — С. 67–72. / *Kolbin A.S., Sidorenko S.V., Zagorodnikova K.A., Lobzin Ju.V., Ivanov D.O., Shabalov N.P. i soavt. Farmakojepidemiologija protivomikrobnnyh sredstv u beremennyh zhenshhin i rodil'nic. Dannye neintervencionnogo retrospektivnogo issledovaniya. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija 2017; 19: 11: 67–72. [in Russian]*
11. Локошкин К.Л., Ширшов В.Н., Попко А.С., Демиденко Ю.Л., Лученкова Н.Д. Современное состояние антибиотикорезистентности и состав возбудителей инфекций мочевых путей у беременных. Вестник урологии. — 2018. — № 6 (2), — С. 13–20. / *Lokoshkin K.L., Shirshov V.N., Popko A.S., Demidenko Ju.L., Luchenkova N.D. Sovremennoe sostojanie antibiotikorezistentnosti i sostav vozбудitelej infekcij mochevyh putej u beremennyh. Vestnik urologii 2018; 6 (2): 13–20. [in Russian]*
12. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Перепанова Т.С., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018» и исследовательская группа «ДАРМИС-2018». Клин микробиол антимикроб химиотер. — 2019. — Т. 21. — № 2. — С. 134–146. / *Palagin I.S., Suhorukova M.V., Dehnich A.V., Ejdel'shtejn M.V., Perepanova T.S., Kozlov R.S. Antibiotikorezistentnost' vozбудitelej vnebol'nicnyh infekcij mochevyh putej v Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo issledovaniya «DARMIS-2018» i issledovatel'skaja gruppa «DARMIS-2018». Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija 2019; 21: 2: 134–146. [in Russian]*
13. Ни О.Г., Очаковская И.Н., Шабанова Н.Е., Пензжоан 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. Антибиотики и химиотер. — 2018. — № 7. — С. 55–61. / *Ni O.G., Ochakovskaja I.N., Shabanova N.E., Penzhojan G.A., Model' G.Ju., Jakovlev S.V. Anketirovanie vrachej dlja opredelenija ishodnogo urovnja znanij kak mehanizm povyshenija jeffektivnosti obrazovatel'nyh meroprijatij v oblasti racional'noj antimikrobnaj terapii. Antibiotiki i himioter 2018; 7: 55–61. [in Russian]*

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сердюкова Дарья Михайловна — к. м. н., с. н. с., врач-клинический фармаколог, отделение клинической фармакологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Шабанова Наталья Евгеньевна — к. м. н., н. с., врач-клинический фармаколог, отделение клинической фармакологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

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

Николаева Анастасия Владимировна — к. м. н., главный врач ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Шмаков Роман Георгиевич — д. м. н., директор института акушерства ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Скоробогатый Алексей Викторович — м. н. с. отделение клинической фармакологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва

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

Медицинские ошибки при применении бета-лактамов антибиотиков: анализ российской базы спонтанных сообщений

*А. В. КУЗЬМИНА¹, И. Л. АСЕЦКАЯ^{1,2}, В. А. ПОЛИВАНОВ¹, С. К. ЗЫРЯНОВ²

¹ ФГБУ «Информационно-методический центр по экспертизе, учёту и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора Москва

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Medication Errors Associated with Beta-Lactam Antibiotics: Analysis of Russian Spontaneous Reporting Database

*A. V. KUZMINA¹, I. L. ASETSKAYA^{1,2}, V. A. POLIVANOV¹, S. K. ZYRYANOV²

¹ Federal State Budget Institution «Informational-Methodological Center for the Expertise, Accounting and Analysis of Medical Products Circulation», Moscow

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow

Был проведён ретроспективный анализ российской базы спонтанных сообщений (СС) за период с 01.01.2012 по 01.08.2014 гг. В исследовании было проанализировано 3608 СС о нежелательных реакциях, развившихся при использовании бета-лактамов антибиотиков, на предмет наличия в сообщениях информации об ошибках при применении этих лекарственных препаратов. Медицинские ошибки (МО) были выявлены в 1043 (28,9%) СС, общее количество МО составило 1214. Отправители самостоятельно указали на факт неверного применения антибиотика в 29 (0,8%) СС. Наиболее распространёнными видами МО являлись: применение антибиотика по незарегистрированным показаниям — 32,5% МО, нарушения дозового режима — 29,7% МО, использование лекарственного препарата при наличии противопоказаний — 17,3% МО. Особую проблему представляет частое назначение антибиотиков при вирусных инфекциях и без учёта данных аллергоанамнеза пациента. Наибольшие доли СС с МО приходились на антибиотики с действующими веществами — цефазолин (50,8% СС на данные препараты), амоксициллин (40,9% СС) и амоксициллин/клавуланат (40,0% СС). Проведённое исследование показывает необходимость разработки мер профилактики МО при применении бета-лактамов антибиотиков в клинической практике.

Ключевые слова: антибиотики, спонтанные сообщения, медицинские ошибки, бета-лактамы, безопасность фармакотерапии.

The authors conducted a retrospective analysis of Russian database of spontaneous reports (SRs) for the period from 01.01.2012 to 01.08.2014. They analyzed 3608 SRs concerning adverse drug reactions associated with beta-lactam antibiotics to identify medication errors (MEs). MEs were detected in 1043 (28.9%) SRs, total amount of MEs was 1214. Medication error-related terms were indicated by reporters in 29 (0.8%) SRs. The most common types of identified MEs were inappropriate indication for the antibiotic — 32.5% MEs, deviations from the recommended dosing scheme — 29.7% MEs, and the use of contraindicated drug — 17.3% MEs. The use of antibiotics for viral infections and errors associated with a patient with documented hypersensitivity to administered drug pose a special problem. The highest number of SRs with MEs was associated with the use of cefazolin (50.8% SRs), amoxicillin (40.9% SRs), amoxicillin/clavulanate (40.0% SRs). The study shows the need to develop measures for prevention of MEs associated with the use of beta-lactam antibiotics in clinical practice.

Keywords: antibiotics, spontaneous reports, medication errors, beta-lactams, drug safety.

Введение

Антибактериальные препараты (АБП) являются одним из самых многочисленных и широко используемых в практическом здравоохранении классов лекарственных средств. В России лидирующие позиции по валовым объёмам продаж в группе антибиотиков в течение многих лет занимают бета-лактамы [1–3].

В связи с клинической значимостью, а также большими объёмами потребления антибиотиков, в частности, бета-лактамов, следует особенно серьёзно относиться к изучению и оценке рисков, связанных с антибактериальной терапией. Особое место занимает проблема медицинских оши-

бок (МО), допускаемых при применении антибактериальных препаратов.

В марте 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выступила с глобальной инициативой, направленной на сокращение числа предотвратимых случаев нанесения ущерба здоровью в результате ошибок применения лекарственных средств во всех странах в течение пяти следующих лет. ВОЗ подчёркивает важность поиска способов предупреждения МО и повышения осведомлённости граждан о рисках, связанных с неправильным использованием лекарственных препаратов (ЛП) [4].

Медицинские ошибки подрывают веру пациентов в систему здравоохранения и увеличивают затраты на лечение больных [5]. По данным Агентства по контролю лекарственных средств и продуктов питания Соединённых Штатов Америки (FDA), около 7 тыс. пациентов в Соединённых

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 109074, г. Москва, Славянская пл. д. 4. стр. 1.

Штатах ежегодно умирают вследствие неправильного использования лекарственных средств [6].

Проблема медицинских ошибок при применении противомикробных препаратов особенно важна, так как неверное, в том числе избыточное, использование лекарственных препаратов (ЛП) данной группы приводит к росту лекарственной устойчивости микроорганизмов, что может иметь существенные последствия для всего мирового здравоохранения. В Российской Федерации (РФ) вопрос предупреждения развития устойчивости бактерий к существующим ЛП стоял в изучаемый период особенно остро в связи с безрецептурным отпуском антибиотиков и отсутствием достаточной информированности населения о правилах использования данной группы лекарственных препаратов [7].

Выявление МО — важнейший шаг на пути к разработке стратегий правильного и безопасного использования ЛП. В настоящее время во многих странах мира метод спонтанных сообщений (СС) рассматривается как важный источник информации о совершаемых ошибках при применении ЛП. В связи с тем, что общее число отечественных исследований в области лекарственных МО невелико и до настоящего времени в РФ отсутствуют работы, посвящённые анализу ошибок при применении АБП на основании данных спонтанной отчётности, изучение этой проблемы в России особенно актуально.

Цель исследования — выявление случаев лекарственных медицинских ошибок и изучение их структуры на основе анализа информации российской базы спонтанных сообщений.

Материал и методы

Дизайн исследования — ретроспективное фармакоэпидемиологическое исследование.

Объектом исследования были спонтанные сообщения о нежелательных реакциях (НР), поступившие в национальную базу данных, подсистему «Фармаконадзор» АИС Росздравнадзора, за период с 01.01.2012 по 01.08.2014 года.

Критерием включения в исследование являлось наличие среди подозреваемых в развитии НР лекарственных средств одного или нескольких антибиотиков группы бета-лактамов.

Критерии исключения: сообщения-дубликаты и невалидные СС. Валидность СС определялась согласно пункту 7.1.2 Правил надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза [8].

Был проведён ретроспективный анализ СС на предмет наличия в них информации об ошибках при применении ЛП. Медицинской ошибкой при применении ЛП считалась любая непреднамеренная ошибка работника системы здравоохранения, пациента или потребителя в назначении, отпуске, дозировке или введении/приёме лекарственного препарата, согласно определению, представленному в Правилах надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза. Случаи намеренного и ненадлежащего применения лекарственного препарата не в соответствии с инструкцией с незаконными или немедицинскими целями («misuse») к МО не относились.

При поиске информации о МО мы принимали во внимание сведения, представленные в повторных спонтанных сообщениях о НР, но при дальнейшем статистическом анализе повторные сообщения не учитывались, поскольку их включение в выборку привело бы к искажению результатов исследования.

Для выявления случаев медицинских ошибок, связанных с назначением АБП, использовались утверждённые в Российской Федерации инструкции по медицинскому применению ЛП, доступные на официальном сайте государственного реестра лекарственных средств [9], а также стандарты оказания медицинской помощи и клинические рекомендации по отдельным нозологиям, которые встречались в нашем исследовании. В ходе исследования анализировались все заполненные пункты СС.

Все выявленные ошибки были разделены на следующие группы: назначение АБП при отсутствии показаний/по неза-регистрированному показанию; назначение ЛП при наличии противопоказаний к его применению; нарушения дозового режима; несвоевременная отмена препарата при развитии НР; несвоевременная смена АБП при его неэффективности; неверная оценка эффективности терапии; нерациональная смена АБП; неверное приготовление раствора антибиотика, применение препарата по неоговоренному в инструкции пути введения; нерациональная комбинация ЛП; назначение неверной схемы лечения заболевания; выбор неверной тактики ведения пациента; неправильный выбор лекарственной формы АБП; случайное непреднамеренное употребление ЛП; нарушение условий хранения антибиотика.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 10.0 для Windows, а также программы Microsoft Office Excel 2007 для персонального компьютера. Описательная статистика была выполнена для всех анализируемых показателей; качественные переменные описаны абсолютными (*n*) и относительными (%) величинами.

Результаты и обсуждение

В исследование вошло 3608 первичных и 145 повторных СС о НР, возникших на фоне использования АБП класса бета-лактамов. В 1123 случаях подозреваемый ЛП относился к группе пенициллинов, в 2324 — цефалоспоринов, 161 — карбапенемов. Из группы монобактамов, также относящейся к бета-лактамам антибиотикам, в России в клинической практике применяется только один представитель — азтреонам. За выбранный нами период времени СС о развитии НР на фоне использования этого ЛП в базе данных АИС Росздравнадзора не зарегистрировано.

МО были выявлены в 1043 сообщениях, т. е. в 28,9% случаев. В большинстве СС (84,9%, 886 СС) имелась информация о совершении одной медицинской ошибки, в 15,1% случаев было выявлено две и более ошибок одновременно: в 144 СС (13,8%) содержались сведения о двух МО, в 12 СС (1,2%) — о трёх и в 1 СС (<0,1%) — о четырёх. Таким образом, общее количество обнаруженных ошибок составило 1214, то есть было больше числа СС с МО.

Наибольший удельный вес СС с МО был зарегистрирован для АБП пенициллиновой группы — 37,1% (417 из 1123 СС). Доли СС с МО при использовании цефалоспоринов и карбапенемов составили 25,2% (586 из 2324 СС) и 24,8% (40 из 161 СС), соответственно.

Отправители самостоятельно указали на ошибки при использовании лекарственного препарата в 29 СС (2,8% СС с выявленными МО, 0,8% всех СС), при этом соответствующий термин, кодирующий МО, в разделе описания НР был вы-

Таблица 1. Распределение спонтанных сообщений с выявленными медицинскими ошибками при применении бета-лактамов антибиотиков по возрастным группам пациентов

Возраст пациента	Число СС с МО (абс.)	% от общего числа СС с МО
0–17 лет (дети)	457	43,8
18–44 года (молодой)	243	23,3
45–59 лет (средний)	144	13,8
60–74 года (пожилой)	113	10,8
75–89 лет (старческий)	48	4,6
90 лет и старше (долгожители)	4	0,4
Не указан	34	3,3
Всего	1043	100,0

бран в 18 из этих сообщений (62,1%, 0,5% всех СС), в других 11 извещениях (37,9%, 0,3% всех СС) информация о факте лекарственной медицинской ошибки содержалась в разделе СС «Значимая дополнительная информация». Это свидетельствует о том, что для выявления проблем, касающихся неверного использования ЛП, необходимо проведение специалистами детального анализа информации, содержащейся в СС; поиск сигналов, связанных с МО, только по указанному отправителем термину в графе описания нежелательной реакции в настоящее время малоинформативен.

Общая характеристика спонтанных сообщений с выявленными медицинскими ошибками. СС, в которых нами были выявлены МО, получены из 61 субъекта Российской Федерации. Наибольшее количество СС с выявленными МО поступило из следующих субъектов России: Астраханская область (12,9%, 135 СС), Алтайский край (10,0%, 104 СС), Москва (9,0%, 94 СС), Амурская область (7,2%, 75 СС), Свердловская область (4,5%, 47 СС). За временной интервал данного исследования эти же регионы входили в первую десятку субъектов РФ по общему количеству СС, зарегистрированных в подсистеме «Фармаконадзор» АИС Росздравнадзора. Активное репортирование в уполномоченные органы о случаях развития НР при применении ЛП свидетельствует о наличии в указанных регионах налаженной системы фармаконадзора.

При анализе демографических показателей пациентов было установлено, что в 59,5% СС с выявленными МО указывался женский пол пациентов, в 38,4% — мужской, в 2,1% случаев информация по данному разделу отсутствовала.

В результате изучения распределения СС с МО по возрастным группам пациентов было выявлено, что самая высокая доля СС с МО была зарегистрирована при использовании АБП у детей до 18 лет — 43,8% (457 СС). Общая доля СС с ошибками при применении АБП у лиц старше 60 лет составила 15,8% (табл. 1).

Большая доля СС с МО при применении бета-лактамов антибиотиков у детей отчасти может объясняться частым использованием данной группы ЛП в педиатрии. Но также необходимо учитывать, что, согласно многим литературным источникам [10–13], риск ошибок фармакотерапии у детей более высокий, чем у взрослых паци-

ентов, и это обусловлено целым рядом факторов: отсутствием у многих ЛП специальных детских лекарственных форм; необходимостью расчёта доз большинства лекарственных препаратов исходя из массы или площади поверхности тела ребёнка; ограниченностью сведений по применению многих ЛП в детской популяции. Кроме того, по мнению некоторых авторов, одной из проблем отечественной педиатрии является слишком агрессивная тактика антибиотикотерапии — необоснованное назначение АБП с первых дней жизни ребёнка, в особенности, при острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ) [14, 15].

Виды выявленных медицинских ошибок при применении бета-лактамов антибиотиков. Распределение МО по видам при применении всех групп бета-лактамов представлено в табл. 2.

32,5 % всех выявленных МО были связаны с назначением АБП вне утвержденных показаний к его применению. При этом в 60,5% из этих случаев ($n=239$) АБП использовали для лечения вирусных заболеваний: в 53,7% случаев ($n=212$) — при ОРВИ, в 2,8% ($n=11$) — с целью терапии других вирусных инфекций (без дополнительных уточнений), 2,8% ($n=11$) — для лечения больных с аденовирусной инфекцией, в 1,0% ($n=4$) — при инфекционном мононуклеозе, в 0,3% ($n=1$) — при гриппе. Ещё в 0,5% сообщений с МО данной группы ($n=2$) содержалась информация о применении антибиотика с целью профилактики ОРВИ. Таким образом, суммарная доля ошибок, связанных с использованием антибиотика при вирусных инфекциях, в данной группе МО составила 61,0% ($n=241$). Также ошибочным мы считали назначение антибиотиков, когда в качестве показаний указывались такие состояния, как лихорадка (6,8%, $n=27$), воспаление (3,8%, $n=15$), кашель (3,0%, $n=12$), боль в горле (1,5%, $n=6$).

На долю ошибок, связанных с назначением АБП вне утвержденных показаний к его применению, в группе пенициллинов приходилось 30,2% всех выявленных случаев неверного использования антибиотика ($n=150$), из них в 62,0% ($n=93$) сообщений в качестве показания были указаны заболевания вирусной этиологии. В группе цефалоспоринов удельный вес подобных ошибок был равен 35,9% ($n=240$), при этом при вирусных инфекциях препарат применяли в

Таблица 2. Виды ошибок при применении бета-лактамов антибиотиков

Виды МО	Количество случаев МО (n)	% от общего числа выявленных МО
Применение при отсутствии показаний/по незарегистрированному показанию	395	32,5
Нарушение кратности применения	153	12,6
Использование в дозе, превышающей рекомендованную	138	11,4
Использование в более низких дозах, чем рекомендовано	47	3,9
Большая длительность терапии	19	1,6
Меньшая длительность лечения	3	0,2
Назначение при наличии противопоказаний	210	17,3
Несвоевременная отмена ЛП при развитии НР	80	6,6
Нерациональная смена АБП	59	4,9
Несвоевременная смена АБП при его неэффективности	31	2,6
Неверное приготовление раствора антибиотика	27	2,2
Неверная оценка эффективности лечения	13	1,1
Нерациональная комбинация ЛП	10	0,8
Применение препарата по неоговоренному в инструкции пути введения	8	0,7
Неверная схема лечения заболевания	6	0,5
Случайное употребление ЛП непреднамеренное	5	0,4
Неверная тактика лечения заболевания	5	0,4
Использование ЛП при несоблюдении условий его хранения	4	0,3
Выбор неверной лекарственной формы	1	0,1
Всего	1214	100

60,0% случаев ($n=144$). В группе карбапенемов 10,0% МО ($n=5$) были связаны с применением антибиотика вне одобренных показаний. Использование карбапенемов при вирусных заболеваниях не зарегистрировано.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературных источников, так как большее количество публикаций последних лет посвящено теме избыточного необоснованного использования противомикробных препаратов [7, 15, 16]. В отличие от других исследований, носящих локальный характер, наша работа позволяет продемонстрировать масштаб проблемы и свидетельствует о том, что подобная практика типична не только для отдельных медицинских учреждений или регионов, но и для всей России в целом.

В общей сложности, 29,7% МО ($n=360$), выявленных в нашем исследовании, заключались в различных нарушениях дозового режима. Случаи несоблюдения рекомендуемой кратности применения препарата составили 12,6% МО ($n=153$), при этом 12,4% МО ($n=151$) приходились на использование антибиотика с меньшей кратностью, чем прописано в инструкции. Несмотря на то что только в 8 СС, где была выявлена меньшая кратность применения АБП, сопровождавшаяся уменьшением суточной дозы ЛП, указывалось на неэффективность проводимой антибактериальной терапии, следует отметить, что в международной практике подобные нарушения рассматриваются как серьезные из-за повышенного риска развития устойчивых штаммов микроорганизмов. Кроме того, следует подчеркнуть, что особенностью фармакодинамики всех бета-лактамов является их принадлежность к лекарственным препаратам с время-зависимой антимикробной активностью. Основным параметром, определяющим клиническую и микробиологическую эффективность этих препаратов, является время, в течение которого концентрация антибиотика в кро-

ви превышает его минимальную подавляющую концентрацию для конкретного возбудителя. Поэтому для обеспечения результативности противомикробной терапии препаратами этой группы крайне важно соблюдать рекомендуемые интервалы введения.

Ещё в 3,9% случаях ($n=47$) имело место использование антибиотика в более низкой дозе, чем рекомендовано. Только в одном извещении содержалась информация о том, что использование АБП в дозе ниже, чем того требует инструкция, могло явиться причиной неэффективности лечения, но практика использования низких доз АБП также активно критикуется в рамках проблемы бактериальной резистентности.

Существуют объективные трудности, связанные с выявлением методом спонтанных сообщений МО, обусловленных нарушением длительности приёма препарата, так как при развитии НР подозреваемый ЛП в большинстве случаев отменяют — досрочно прекращают лечение, либо проводят смену терапии. Нам удалось установить МО подобного рода только в тех сообщениях (1,8% МО, $n=22$), где НР носили отсроченный характер и возникли через некоторое время после окончания полного курса лечения.

С нарушениями дозового режима были связаны 34,9% МО ($n=173$) в группе пенициллинов, 24,7% МО ($n=165$) в группе цефалоспоринов и 44,0% МО ($n=22$) в группе карбапенемов. При этом нарушения кратности применения препарата составляли 17,7% случаев МО ($n=88$) при использовании пенициллинов, 8,2% МО ($n=55$) — при использовании цефалоспоринов и 20,0% — МО ($n=10$) при использовании карбапенемов.

17,3% всех выявленных МО ($n=210$) касались использования АБП при наличии противопоказаний к его применению, при этом 71,4% из этих случаев ($n=150$) были связаны с назначением ЛП пациентам, имеющим в прошлом аллергические

реакции на данный препарат или на препараты сходной химической структуры.

11,9% МО ($n=59$) при использовании пенициллинов и 13,2% МО ($n=88$) при применении цефалоспоринов заключались в назначении антибиотика больным, у которых в прошлом уже отмечались аллергические реакции на этот препарат или на препараты той же группы. При применении карбапенемов доля ошибок подобного рода составила 6,0% случаев ($n=3$).

Результаты других исследований также свидетельствуют о том, что проблема качества сбора алергоанамнеза до сих пор остаётся актуальной, и наши данные по этому пункту согласуются с информацией, представленной в источниках литературы [17, 18]. При этом наша работа также показывает опасность ошибок подобного рода. Так, в 48,0% СС (72 СС), содержащих информацию об использовании бета-лактамов антибиотиков у пациентов с гиперчувствительностью к данным ЛП, было указано на развитие серьёзных аллергических реакций. В 14,0% случаях (21 СС) НР заключались в возникновении ангионевротического отёка, в 5,3% случаях (8 СС) имело место развитие анафилактического шока, в 3,3% (5 СС) — токсикодермии, ещё в 3,3% (5 СС) — бронхоспазма, в 1,4% (2 СС) описано развитие синдрома Стивенса-Джонсона, в 0,7% (1 СС) — синдрома Лайелла, в остальных 20,0% (30 СС) извещений нежелательные реакции включали в себя различные кожные проявления медикаментозной аллергии (сыпь, кожный зуд), которые требовали госпитализации пациента или её продления.

МО других видов встречались в СС значительно реже.

Доли спонтанных сообщений с медицинскими ошибками в разных подгруппах бета-лактамов антибиотиков. Из всех сообщений, содержащих информацию о развитии НР при применении антибиотиков пенициллинового ряда, 94,3% СС пришлось на препараты с пятью международными непатентованными наименованиями (МНН): амоксициллин/клавуланат — 462 СС, амоксициллин — 279 СС, ампициллин/сульбактам — 127 СС, ампициллин — 113 СС, бензилпенициллин — 78 СС. Различия в количестве СС отражают частоту использования АБП в медицинской практике. Согласно информации, предоставленной DSM Group, в период проведения данного исследования, наибольший объём аптечных продаж среди всех пенициллинов приходился на генерические препараты на основе амоксициллина. Нами было выявлено, что доля СС с МО при использовании препаратов с вышеуказанными МНН, также самая высокая и достигает 40,9% (рис. 1).

В 94,1% СС о НР, развившихся на фоне использования антибиотиков группы цефалоспоринов, были указаны препараты со следующими МНН: цефтриаксон — 1251 СС, цефотаксим — 411 СС, цефазолин — 305 СС, цефоперазон/суль-

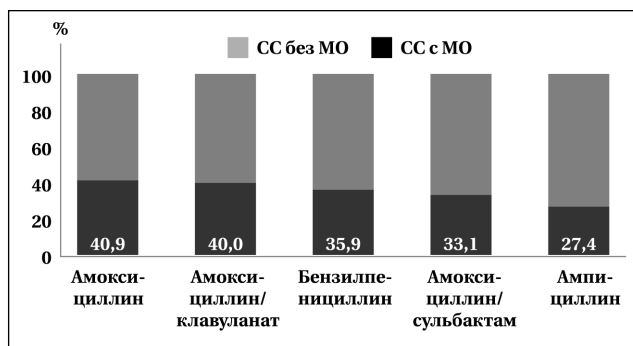


Рис. 1. Доли спонтанных сообщений с медицинскими ошибками при применении различных антибиотиков пенициллиновой группы.

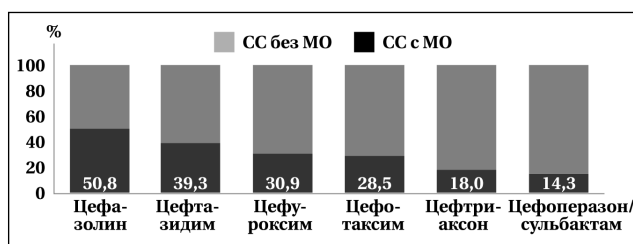


Рис. 2. Доли спонтанных сообщений с медицинскими ошибками при использовании различных препаратов группы цефалоспоринов

бактам — 91 СС, цефуроксим — 68 СС, цефтазидим — 61 СС. Наибольшее общее количество СС поступило на препараты цефтриаксона, но самый большой удельный вес СС с МО приходится на ЛП с МНН цефазолин — 50,8% (рис. 2).

Всего за выбранный нами временной интервал было получено 76 СС о развитии НР при применении ЛП с МНН меропенем, случаи неверного использования этого антибиотика были выявлены в 20 СС (26,3%). В исследование было включено 71 СС о развитии НР при использовании ЛП с МНН имипенем/циластатин. МО были обнаружены в 18 из них (25,4%). На ЛП с МНН эртапенем в базе данных было зарегистрировано 14 СС, в 2 из них содержалась информация о МО (14,3%). СС о развитии НР на фоне применения ЛП с МНН дорипенем за указанный промежуток времени в российскую базу данных не поступало. Малое количество извещений на карбапенемы обусловлено относительно редким использованием препаратов данной группы по сравнению с другими представителями бета-лактамов, а также сложностью выявления НР: так как эти антибиотики используются при серьёзных инфекциях, на фоне тяжёлого состояния пациентов, многие возникающие в процессе лечения симптомы могут расцениваться врачами как проявления или осложнения основного заболевания, а не следствие использования лекарственного препарата.

Заключение

На основании анализа национальной базы спонтанных сообщений было установлено, что доля сообщений, где бета-лактамы антибиотиков

назначались с ошибками, в целом составила 28,9%. Отправители самостоятельно указали на ошибки при использовании лекарственного препарата в 0,8% спонтанных сообщений; в графе описания нежелательной реакции кодирующий медицинскую ошибку термин был указан в 0,5% спонтанных сообщений. Таким образом, в настоящее время автоматический поиск случаев МО в базе данных затруднён и для выявления ошибок при применении ЛП требуется полный анализ всей информации, представленной в спонтанных сообщениях. Наши данные показывают, что в рамках образовательной деятельности по вопросам фармаконадзора следует акцентировать внимание специалистов здравоохранения на необходимости качественного заполнения формы-извещения о нежелательной реакции: вносить информацию во все имеющиеся графы, в случаях ошибок при применении лекарственного препарата в графе «Описание НР» обязательно выбирать термин, кодирующий этот факт.

Наиболее распространёнными видами медицинских ошибок, выявленных в спонтанных со-

общениях, являлись следующие: применение антибиотика при отсутствии показаний — 32,5% случаев медицинских ошибок (из них в 61,0% — при вирусных инфекциях); нарушения дозового режима — 29,7% случаев; назначение лекарственного препарата при наличии противопоказаний — 17,3% случаев (из них в 71,4% — при наличии у пациента в анамнезе аллергии на подозреваемый препарат или препараты той же группы). Эти результаты свидетельствуют о том, что в Российской Федерации сохраняются проблемы нерационального использования АБП при вирусных инфекциях, несоблюдения рекомендованных режимов дозирования антибиотиков и качества сбора лекарственного анамнеза, с учётом возможности возникновения перекрёстной аллергии на препараты со схожей химической структурой. Меры, направленные на решение этих проблем, позволят уменьшить частоту ошибок при применении не только бета-лактамов антибиотиков, но и всего класса АБП и, таким образом, повысить безопасность лечения значительного числа пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Центр маркетинговых исследований: ЦМИ «Фармэксперт». Аналитический обзор фармацевтического рынка. — 2009. — № 10 (74). — С. 9–31. / Centr marketingovyh issledovanij: CMI «Farmjeksper». Analiticheskij obzor farmacevticheskogo rynka 2009; 10 (74): 9–31. [in Russian]
2. DSM Group. Фармацевтический рынок России 2013 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.dsm.ru/docs/analytics/dsm_report2013.pdf / DSM Group. Farmaceuticheskij ryok Rossii 2013 [Elektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: http://www.dsm.ru/docs/analytics/dsm_report_2013.pdf [in Russian]
3. DSM Group. Рейтинг продаж антибиотиков в России 2016 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.dsm.ru/news/269/?sphrase_id=5665 / DSM Group. Rejting prodazh antibiotikov v Rossii 2016 [Elektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: http://www.dsm.ru/news/269/?sphrase_id=5665 [in Russian]
4. WHO launches global effort to halve medication-related errors in 5 years [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/medication-relatederrors/en/>
5. Jha A. K., Prasopa-Plaizier N., Larizgoitia I. et al. Research Priority Setting Working Group of the WHO World Alliance for Patient Safety. Patient safety research: an overview of the global evidence. Qual Saf Health Care 2010; 19: 1: 42–47.
6. Holquist C. Medication errors: an FDA perspective. European Union Regulatory Workshop on Medication Errors [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2013/03/WC500139886.pdf
7. Козлов Р. С. Проблема антибиотикорезистентности в педиатрии. Русский медицинский журнал. — 2014. — № 3. — С. 238. / Kozlov R. S. Problema antibiotikorezistentnosti v pediatrii. Russkij medicinskij zhurnal 2014; 3: 238. [in Russian]
8. Правила надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года №87. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/456026106>. / Pravila nadlezhashhej praktiki farmakonadzora Evrazijskogo jekonomicheskogo sojuza. Utverzhdeny Resheniem Soveta Evrazijskoj jekonomicheskoi komissii ot 3 nojabrja 2016 goda №87. Rezhim dostupa: <http://docs.cntd.ru/document/456026106> [in Russian]
9. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/> / Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv [Elektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://grls.rosminzdrav.ru/>
10. Kaushal R., Bates D. W., Landrigan C. et al. Medication errors and adverse drug events in pediatric inpatients. Journal of the American Medical Association 2001; 285 (16): 2114–2120.
11. Wong I. C., Ghaleb M. A., Franklin B. D., Barber N. Incidence and Nature of Dosing Errors in Paediatric Medications. Drug Safety 2004; 27: 661.
12. Ghaleb M. A., Barber N., Franklin B. D., Wong I. C. The incidence and nature of prescribing and medication administration errors in paediatric inpatients. Arch Dis Child 2010; 95: 113–118.
13. Manias E., Kinney S., Cranswick N., Williams A. Medication errors in hospitalised children. J Paediatr Child Health 2014; 50 (1): 71–77.
14. Бондарь Г. Н., Лучанинова В. Н. Применение антибактериальных препаратов у детей при острых респираторных инфекциях в амбулаторной практике Владивостока. Педиатрическая фармакология. — 2007. — № 4 (1). — С. 19–22. / Bondar' G. N., Luchaninova V. N. Primenenie antibakterial'nyh preparatov u detej pri ostryh respiratornyh infekcijah v ambulatornoj praktike Vladivostoka. Pediatricheskaja Farmakologija 2007; 4 (1): 19–22. [in Russian]
15. Пономарева Ю. В. Актуальные аспекты антибиотикотерапии в педиатрической практике. Лекарственный вестник. — 2011. — № 6 (41). — С. 19–27. / Ponomareva Ju. V. Aktual'nye aspekty antibiotikoterapii v pediatricheskoj praktike. Lekarstvennyj vestnik 2011; 6 (41): 19–27. [in Russian]
16. Якимова Ю. Н., Решетко О. В. Поведение фармацевтических работников при отпуске антибиотиков для системного применения. Фармакоэкономика: теория и практика. — 2016. — № 1. — С. 225. / Jakimova, Ju. N., Reshetko O. V. Povedenie farmacevticheskikh rabotnikov pri otpuske antibiotikov dlja sistemnogo primeneniya. Farmakoeconomika: teorija i praktika 2016; 1: 225. [in Russian]
17. Фоминых С. Г. Рейтинг врачебных заблуждений при назначении антибактериальных средств: ретроспективный анализ экспертной работы врачебно-клинического фармаколога. Клин микробиол антимикроб химиотер. — 2017. — № 19 (1). — С. 73–79. / Fominyh S. G. Rejting vrachebnyh zabluzhdenij pri naznachenii antimikrobnnyh sredstv: retrospektivnyj analiz jekspertnoj raboty vracha-klinicheskogo farmakologa. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija 2017; 19 (1): 73–79. [in Russian]
18. Avery T., Barber N., Ghaleb M. et al. Investigating the prevalence and causes of prescribing errors in general practice: ThePRACtICE Study (PRevalence And Causes of prescribing errors in general practice). A report for the General Medical Council 2012; 22: 162.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузьмина Анна Вячеславовна — к. м. н., Главный специалист Центра фармаконадзора ФГБУ «Информационно-методический центр по экспертизе, учёту и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора (ЦФ ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора), Москва

Асецкая Ирина Львовна — к. м. н., Главный специалист фармаконадзора ЦФ ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора, Москва; доцент кафедры общей и клинической фарма-

кологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН), Москва

Полванов Виталий Анатольевич — Руководитель ЦФ ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора, Москва

Зырянов Сергей Кенсаринович — д. м. н., профессор, Заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, Москва; заместитель главного врача по терапии ГБУЗ «ГКБ №24 ДЗМ г. Москвы»

Морские водоросли и сахарный диабет 2 типа: новые стратегии в терапии

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, С. П. ЕРМАКОВА², Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, *И. Д. МАКАРЕНКОВА¹,
С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ³, Б. Г. АНДРЮКОВ¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹

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

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

³ Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

Algae and Type 2 Diabetes: New Treatment Strategies

N. N. BESEDNOVA¹, S. P. ERMAKOVA², T. A. KUZNETSOVA¹,
*I. D. MAKARENKOVA¹, S. P. KRIZHANOVSKY³, B. G. ANDRYUKOV¹, T. S. SAPOROZHETS¹

¹ Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

³ Medical Association of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

Обзор содержит материалы последних лет, касающиеся действия экстрактов, полисахаридов и полифенолов из морских водорослей при сахарном диабете 2-го типа, являющихся потенциальной основой для создания эффективных антигипергликемических средств. Эти биополимеры являются поливалентными биомодуляторами, обладающими многокомпонентным действием при диабете. Они снижают уровень глюкозы в крови, повышают продукцию инсулина, уменьшают инсулинорезистентность, ингибируют продукцию α -амилазы и α -глюкозидазы, обладают антиоксидантной и противовоспалительной активностью, защищают ткани поджелудочной железы, печени и почек от высоких концентраций глюкозы. Морские водоросли — перспективные кандидаты для создания лекарственных препаратов нового поколения с ассоциированной активностью, продуктов функционального питания и биологически активных добавок к пище для использования при сахарном диабете 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, сульфатированные полисахариды, полифенолы, фукоидан, экстракты, водоросли.

The review contains recent materials on the effects of extracts, polysaccharides, and polyphenols from brown algae in type 2 diabetes mellitus, which are a potential basis for creating effective antihyperglycemic agents. These biologically active substances are polyvalent biomodulators that have a multi-component effect in diabetes. These biopolymers reduce blood glucose levels, increase insulin production, decrease insulin resistance, inhibit α -amylase and α -glucosidase production, have antioxidant and anti-inflammatory activity, protect pancreatic, liver, and kidney tissues from high glucose concentrations. Algae are promising candidates for creating new generation drugs with associated activity, functional foods and dietary supplements for use in type 2 diabetes mellitus.

Keywords: type 2 diabetes, sulfated polysaccharides, polyphenols, fucoidan, extracts, algae.

Введение

В настоящее время Всемирная организация здравоохранения определяет ситуацию с сахарным диабетом как «неинфекционную эпидемию». Эксперты предполагают, что к 2025 г. в мире будет около 300 млн больных диабетом. Международная федерация диабета прогнозирует увеличение заболеваемости во всем мире к 2030 г. с 8,3 до 9,9% [1].

Сахарный диабет 2 типа (СД-2) является одной из 10 ведущих причин смерти в развитых странах. В 80% случаев гибель пациентов обус-

ловлена в первую очередь сердечно-сосудистыми заболеваниями (инфаркт миокарда, инсульт), тогда как от самого СД-2 погибают не более 1% больных. В связи с этим кардиологическая ассоциация США, например, относит сахарный диабет к сердечно-сосудистой патологии.

Лечение диабета, в основном, включает в себя получение стойкого снижения гипергликемии с использованием пероральных гипогликемических средств в дополнение к вводимому парентерально инсулину. Тем не менее, заметные побочные эффекты таких препаратов являются основной причиной поиска альтернативных методов лечения, которые могут сопровождаться менее серьезными нежелательными явлениями или не будут иметь их совсем [2].

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 690087, Владивосток, Сельская, 1, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, e-mail: ilona_m@mail.ru

Одним из возможных путей повышения эффективности лечения СД-2 и предотвращения нежелательных эффектов является коррекция функций организма с использованием в качестве вспомогательной терапии биологически активных веществ (БАВ) из морских гидробионтов, представляющих собой сложные химические соединения, в том числе и не образующиеся в ряде случаев в организме человека. К ним относятся полисахариды (в том числе, сульфатированные — СПС), лектины, полифенолы и пр., обладающие антиоксидантной, гиполипидемической, иммуномодулирующей, гипогликемической, противовоспалительной, антикоагулянтной активностями и характеризующиеся отсутствием токсичности [3]. Широкий полифункциональный спектр действия биологически активных веществ из гидробионтов и их способность эффективно воздействовать на патогенетические мишени при СД-2 позволяют рекомендовать многие из этих соединений в качестве основы для разработки новых лекарственных препаратов, биологически активных добавок к пище (БАД) и дополнительных ингредиентов в продукты функционального питания.

Согласно современным представлениям, в основе СД-2 лежат два основных патогенетических механизма, связанных с главными мишенями для лекарственных воздействий: инсулинорезистентность периферических тканей (мышечной, жировой, печёночной) и снижение секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы. При этом у большинства больных СД-2 ведущим патогенетическим фактором является инсулинорезистентность.

Большого внимания при диабете требует также окислительный стресс, играющий как и предыдущие факторы, значительную роль в возникновении осложнений и являющийся одним из патогенетических механизмов при этой патологии [4]. Активация свободнорадикального окисления наблюдается как при впервые выявленном СД-2, так и при длительном течении болезни [5]. Свободные радикалы могут способствовать развитию гипергликемии за счёт дисфункции митохондрий, а неферментативное гликозилирование — развитию окислительного стресса, поскольку гликозилированные белки являются источником свободных радикалов [6]. В свою очередь, окислительный стресс вызывает дисфункцию эндотелия, которая играет ключевую патогенетическую роль в развитии микро- и макроангиопатий. Окислительный стресс, индуцированный гипергликемией, запускает механизмы повреждения β -клеток поджелудочной железы и тем самым ускоряет прогрессирование болезни.

Одной из важнейших мишеней лекарственного воздействия при СД-2 являются α -глюкозидаза и α -амилаза. Альфа-амилаза — фермент, участ-

вующий в разрушении крахмала и гликогена, расщепляет α -(1—4)-связи, главным образом, в амилозе и частично в амилопектине; α -глюкозидаза принимает участие в переваривании углеводов, является ферментом класса гидролаз, катализирующим гидролитическое расщепление мальтозы на две молекулы глюкозы, и действующим также и на другие α -D-глюкозиды.

Назначение пациентам с диабетом только сахароснижающих препаратов не позволяет одновременно охватить несколько ключевых сторон патогенеза, а, следовательно, добиться целевых показателей гликемии и предотвратить развитие сосудистых осложнений этого заболевания. До настоящего времени не существует лекарств или методов лечения СД-2, которые при значительном терапевтическом эффекте были бы совершенно безопасными для организма [7].

В связи с этим в настоящем обзоре представлены литературные материалы последних лет о потенциальных возможностях экстрактов, полисахаридов и полифенолов морских водорослей одновременного воздействия на несколько ключевых мишеней патогенеза СД-2: уровень инсулина в крови, толерантность к глюкозе, продукцию α -амилазы и α -глюкозидазы, а также оксидативный стресс.

Экстракты

В последние годы из-за побочных нежелательных эффектов синтетических гипогликемических препаратов стал очень популярным поиск альтернативных терапевтических подходов. Особый интерес в этом плане представляют морские водоросли, поскольку экстракты из них эффективны при ряде заболеваний, не имеют побочных эффектов или они незначительны, стоимость их получения невысока.

Водоросли обладают высоким биомедицинским потенциалом, так как являются богатейшим источником структурно разнообразных биологически активных соединений, которые чаще всего отсутствуют в наземных растениях. Эти гидробионты и их метаболиты уже давно являются или пищевыми продуктами, или компонентами продуктов функционального питания.

Большинство научных исследований, касающихся антидиабетического действия морских водорослей, проведено в экспериментах на животных или клеточных культурах с использованием экстрактов и даже порошков из этих гидробионтов, что обусловлено, с одной стороны, необходимостью получения доступных всем слоям населения средств для коррекции углеводного и липидного обмена при диабете, с другой — стремлением разработать дешёвую технологию получения нетоксичных и достаточно эффективных антидиабетических средств. Однако пока ещё много

неясных вопросов, связанных с ролью отдельных БАВ в антидиабетических эффектах экстрактов и порошков, которые требуют своего решения.

Хроническое воспаление в жировой ткани играет важную роль в развитии инсулинорезистентности. Высокая стоимость и ряд неблагоприятных побочных эффектов средств против ожирения и воспаления обуславливают проведение скрининга природных источников противовоспалительных средств.

В связи с этим обращают на себя внимание исследования J.-H. Oh и соавт. [8], получивших обнадеживающие результаты при использовании у мышей C57BL/6N, в течение длительного времени находившихся на диете с высоким и низким содержанием жира, порошков 4 видов сухих водорослей. Авторы установили, что добавление в корм животных бурых водорослей, особенно *Saccharina japonica*, в виде порошков в количестве 5% от суточного рациона может ингибировать воспалительные явления в жировой ткани, а также приводить к снижению инсулинорезистентности и концентрации глюкозы в крови по сравнению с показателями контрольной группы (уровень глюкозы: $175,8 \pm 3,35$ мг/дл у мышей, получавших порошок водоросли, и $227,6 \pm 1,46$ мг/дл у контрольных животных). В жировой ткани семенников мышей, получавших в составе диеты с повышенным содержанием жира порошки сухих водорослей, количество погибших адипоцитов было в три раза меньше по сравнению с животными контрольной группы. У этих же мышей наблюдалась более низкая экспрессия макрофагами провоспалительного IL-6. Особенно выражено это было при использовании порошка водоросли *S.japonica*.

Известно, что в развитии воспаления, связанного с ожирением, значительную роль играют макрофаги костномозгового происхождения. J.-H. Oh и соавт. [8] обрабатывали эти клетки агонистом толл-подобных рецепторов (TLR) — липополисахаридом для стимуляции воспалительного ответа. У мышей, получавших диету с повышенным содержанием жира, наблюдалась более выраженная экспрессия IL-1 β макрофагами по сравнению с экспрессией интерлейкина клетками мышей, получавших такую же диету в комбинации с водорослями ($8,73 \pm 0,52$ пг/мл и $3,83 \pm 0,53$ пг/мл, соответственно). Наиболее высокий показатель ингибирования продукции IL-6 был отмечен для макрофагов мышей, получавших диету с высоким содержанием жира вместе с порошком водоросли *S.japonica* (мыши, получавшие только жировую диету, — $1051 \pm 6,70$ пг/мл; мыши, получавшие диету и *S.japonica* — $1008 \pm 1,36$ пг/мл). Остальные водоросли такого выраженного противовоспалительного эффекта не оказывали. Увеличение системной чувствительности к инсулину у мышей, получавших

водоросли, авторы связывают с низкими показателями гибели адипоцитов в жировой ткани гонад, а также с меньшей степенью примирования макрофагов.

Как следует из приведённых результатов, не все водоросли обладают высоким противодиабетическим потенциалом. В исследованиях J.-H. Oh и соавт. [8] только один из четырех видов водорослей — *S.japonica* — проявлял достаточно высокую активность как антидиабетический агент, обладающий при этом и значительным противовоспалительным потенциалом. Действие остальных трёх — *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* и *Sargassum fulvellum* было значительно слабее. Однако, по-видимому, даже использование в рационе больных с ожирением и СД-2 некоторых водорослей в виде порошков может внести положительный вклад в лечение таких пациентов.

В зависимости от растворителя, используемого для получения экстрактов водорослей, последние могут иметь высокое содержание полифенолов и других низкомолекулярных соединений (этилацетатные экстракты) или содержать до 70–80% полифенольных соединений и 20–30% полисахаридов (этанольные экстракты), или >90% полисахаридов и очень небольшое количество полифенолов (водные экстракты) [9].

О способности этилацетатных экстрактов зелёной (*Ulva fasciata*) и бурой (*Sargassum wightii*) водорослей снижать уровень глюкозы в крови мышей с экспериментальным стрептозотациновым диабетом сообщили L. Mohapatra и соавт. [10]. Общее содержание полифенолов в экстракте составляло $207,23 \pm 2,41$ мг/г. Оба экстракта были нетоксичны до 2000 мг/кг. Уровень глюкозы в плазме крови натощак у животных, получавших экстракты в дозе 200 мг/кг, значимо снизился уже на 6-й день после начала лечения. В глюкозотолерантном тесте, определяющем способность организма эффективно использовать глюкозу после еды или нагрузки глюкозой, наблюдалось уменьшение толерантности к ней.

При диабете комплекс характерных особенностей липидного состава крови, получивший название «диабетическая дислипидемия», включает повышенную концентрацию общих сывороточных триглицеридов (ТГ) вследствие увеличения транспортировки свободных жирных кислот из жировой ткани, ТГ очень низкой плотности, низкую концентрацию липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и в целом нормальную концентрацию общего холестерина (ОХ) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). У животных, леченных экстрактами водорослей в дозе 200 мг/кг, имело место значимое снижение ТГ и ЛПНП в крови и ТГ в печени и мышцах. Оба экстракта значительно повышали содержание гликогена в печени и мышцах, а также обладали антиоксидантными свойствами — увеличивали уровень су-

пероксиддисмутазы (СОД) в скелетных мышцах [10]. Антидиабетический эффект экстрактов водорослей авторы связывают с гипогликемическим, антиоксидантным и липидрегулирующим действием, а также со способностью ингибировать α -амилазу.

Известно, что уровень гликогена в различных тканях, особенно в печени и скелетных мышцах является прямым отражением активности инсулина, стимулирующего активность гликоген-синтазы и ингибирующего гликоген-фосфатазу. Уменьшение содержания гликогена в печени при диабете происходит из-за недостатка инсулина, что приводит к инактивации гликоген-синтазы. В работе [11] показано резкое уменьшение количества гликогена в печени и в скелетных мышцах мышей с экспериментальным диабетом. Так, в печени животных с диабетом количество гликогена составляло $10,5 \pm 1,87$ мг/г ткани, а у интактных животных — $32,37 \pm 3,75$ мг/г ткани. У мышей, получавших экстракты, наблюдался подъём уровня гликогена (экстракт *S.wightii* — $22,37 \pm 2,5$ мг/г, экстракт *U.fasciata* — $28,62 \pm 2,5$ мг/г ткани). По их мнению, использование экстрактов этих водорослей может свести к минимуму развитие серьёзных осложнений у больных диабетом 2-го типа.

У животных с экспериментальной гипергликемией наблюдалась деструкция гепатоцитов, клеток паренхимы и выраженный стеатоз, тогда как у мышей, получавших этилацетатные экстракты, отмечены положительные морфологические изменения, в частности, снижение жировой инфильтрации печени и явлений гепатоза. На основании полученных результатов авторы считают, что необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этих результатов и разработки рекомендаций по питанию этими морскими водорослями для пациентов с диабетом 2-го типа [10].

Скелетные мышцы играют ключевую роль в поддержании гомеостаза глюкозы [11]. Передача сигналов инсулина, способствующих поглощению глюкозы в скелетных мышцах, инициируется активацией фосфатидил-инозитол-3 киназы и протеин-киназы (семейство протеинкиназы В). Кроме того, 5'-аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (АМРК) является ещё одной важной сигнальной молекулой, способствующей внутриклеточному поглощению глюкозы независимо от инсулина. АМРК активируется физическими упражнениями и антидиабетическими препаратами (например, метморфином), а также различными фитохимическими веществами.

S. Y. Kang и соавт. [12] на модели клеток скелетных мышц *in vivo* и *in vitro* установили, что водные экстракты двух бурых водорослей *S.japonica* и *H.fusiforme* способны стимулировать включение в миобласты клеточной линии C₂C₁₂, результаты

при этом были сопоставимы с таковыми при действии инсулина. В составе экстрактов было установлено незначительное количество полифенолов: 2,084 (*S.japonica*) и 3,215 (*H.fuziforme*) мкг галловой кислоты/мл. Оба экстракта дозозависимо ингибировали активность α -глюкозидазы. При этом экстракт *H.fuziforme* в концентрации 8 мг/мл значительно интенсивнее ингибировал фермент (87,02%) по сравнению с экстрактом *S.japonica* (27,53%). Важно отметить тот факт, что под действием экстрактов не снижалась жизнеспособность клеток. Длительное кормление мышей (16 нед.) измельчёнными лиофилизированными водорослями позволило установить, что активность белков, связанных у этих животных с сигнальным путём действия инсулина (АКТ и АМРК) была значительно выше, чем у мышей, не получавших гидробионты.

В этих же экспериментах было установлено и противовоспалительное действие экстрактов. У мышей, получавших водные экстракты водорослей *S.japonica* и *H.fusiforme*, было отмечено двукратное снижение уровня провоспалительного цитокина TNF α в мышцах.

Авторы позиционируют водные экстракты водорослей в качестве потенциальных терапевтических агентов для снижения мышечной резистентности к инсулину, однако, как и большинство авторов, работавших с такими объектами, не определяют содержание других компонентов (например, полисахаридов). Поэтому авторы указывают на необходимость изучения компонентов экстрактов или их сочетаний для установления ответственных за эту активность веществ.

Для коррекции нарушений в печени и селезёнке, связанных с патологическими изменениями углеводного и липидного обменов у крыс Sparague–Dawley с экспериментальным диабетом и ожирением, M. Motshakeri и соавт. [13] использовали водный и этанольный экстракты бурой водоросли *Sargassum polycystum*. У крыс с диабетом был значительно повышен уровень глюкозы в крови ($20,3 \pm 0,8$ ммоль/л против $4,9 \pm 0,3$ ммоль/л у интактных животных), а также гликозилированного гемоглобина. Пероральное применение как этанолового, так и водного экстрактов *S.polycystum* (в дозах 150 и 300 мг/кг массы тела) значительно снижало уровень глюкозы в крови крыс. Авторы также представили в работе картину патоморфологических изменений тканей печени и почек. Оказалось, что оба экстракта оказывали защитное или восстанавливающее действие на клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе крыс, значительно уменьшали явления некроза, а в печени и почках — дегенеративные изменения, восстанавливалось также нормальное строение органов. Число некротизированных клеток в поджелудочной железе и в печени снижалось при до-

зе 300 мг/кг этанольного экстракта ($29,46 \pm 1,47\%$ против $51,14 \pm 1,57\%$ у крыс с диабетом, получавших экстракт; $5,4 \pm 0,2\%$ против $62,8 \pm 0,6\%$ у диабетических крыс, соответственно).

В другой работе этих авторов [14] на долгосрочной модели ожирения и СД-2 параллельно с диабетическими были определены значения липидного обмена. Было установлено, что использование этанольных экстрактов водорослей не только значительно снижало уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, но и вносило положительные коррективы в измененный липидный обмен диабетических крыс.

Комбинация IL-1 β и IFN γ индуцирует гибель β -клеток поджелудочной железы посредством индукции синтеза NO и экспрессии iNOS, что коррелирует со снижением секреции инсулина в клетках RIN. Этанольный экстракт в дозах 10 и 25 мкг/мл значительно снижал продукцию NO в клетках RIN (с 30,7 мкмоль/л до 24,7 и 21,6 мкмоль/л, соответственно) и в зависимости от дозы ингибировал экспрессию белка iNOS, уменьшал гибель β -клеток. До воздействия на клетки экстракта жизнеспособность клеток, обработанных IL-1 β и IFN γ , составляла 44,8%. Добавление этанольного экстракта (в дозах 10 и 25 мкг/мл) увеличивало жизнеспособность β -клеток до 61,3 и 65,9%, соответственно.

Этанольный экстракт водоросли увеличивал также секрецию инсулина клетками RIN и усиливал поглощение глюкозы адипоцитами 3T3-L1, демонстрируя, по мнению авторов, перспективность использования в качестве антидиабетического средства. Что же касается действующего начала, то экстракт содержит различные типы химических компонентов от полифенолов и стеролов до витаминов и минералов [15].

Метанольный экстракт водоросли *Sargassum hystrix*, в составе которого, как правило, регистрируется высокое содержание полифенолов, обладал способностью снижать уровень глюкозы до и после приёма пищи у крыс с экспериментальным стрептозотациновым диабетом, предотвращал развитие некроза поджелудочной железы и восстанавливал β -клетки [2].

Одним из подходов к лечению СД-2 является ингибирование активности α -амилазы и α -глюкозидазы — важнейших мишеней лекарственного воздействия. Ингибиторы этих ферментов замедляют расщепление сложных углеводов на простые сахара, тем самым снижая поглощение глюкозы.

Экстракты водорослей в качестве ингибиторов ферментов не дают побочных явлений, которые вызывают синтетические препараты. Ингибиторы α -глюкозидаз не стимулируют секрецию эндогенного инсулина, поэтому их замедляющее влияние на развитие СД-2 у лиц с нарушением толерантности к глюкозе И. Ю. Демидова и Т. Е. Чазова [16] объясняют протективным действием

препаратов на функцию β -клеток, что обеспечивает постпрандиальную нормогликемию.

Наиболее частым побочным эффектом официнальных лекарственных препаратов акарбозы и миглитол, которые используют в качестве ингибиторов α -амилазы и α -глюкозидазы, является диспепсия. Распад углеводов ограничивается действием лекарственного препарата, что приводит к повышенному газообразованию при ферментации. У 60–70% пациентов, применяющих акарбозу или миглитол, наблюдается развитие метеоризма, колик и диареи, что само по себе не опасно, но неприятно для пациентов и приводит в ряде случаев к отказу от применения препаратов.

В связи с тем, что в практической медицине используются единичные лекарственные препараты — ингибиторы α -глюкозидаз, актуален поиск соединений, не оказывающих развитие побочных эффектов, но являющихся ингибиторами ферментов. Так, М. Н. Park и J. S. Han [17] установили гипогликемический эффект метанолового экстракта из бурой водоросли *Padina arborescens* у мышей с экспериментальным диабетом, вызванным стрептозотацином. Авторы определяли ингибирующее действие метанольного экстракта на α -глюкозидазу и α -амилазу, а также уровень глюкозы в крови. Ингибирующий эффект метанольного экстракта водоросли по отношению к ферментам был выше, чем у акарбозы, концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) которой по отношению к α -глюкозидазе составила $0,34 \pm 0,02$ мг/мл; к α -амилазе — $0,45 \pm 0,04$ мг/мл, а IC_{50} экстракта водоросли — $0,26 \pm 0,05$ мг/мл и $0,23 \pm 0,003$ мг/мл, соответственно. Отмечено значительное подавление уровня глюкозы крови после приёма пищи у животных, получавших экстракт.

Продукты бурой водоросли в качестве ингибиторов гидролитических ферментов в тонком кишечнике авторы представляют в качестве компонентов функционального питания, что позволит уменьшить постпрандиальное увеличение глюкозы в крови в процессе смешанной углеводной диеты. В связи с этим, по мнению авторов, актуально продолжение исследований с целью точного определения действующего начала экстракта, поскольку при экстракции идёт извлечение биологически активных соединений различных классов.

Уровень и специфичность антиферментативной активности индивидуален для каждого вида водоросли. Так, при исследовании эффективности неочищенных водных экстрактов различных водорослей установлено, что очень высокая ингибирующая активность по отношению к α -глюкозидазе была характерна, например, для водного экстракта из зелёной водоросли *Halimeda macroloba* (IC_{50} — 6,388 мг/мл). Экстракты же из бурых

водорослей *Padina sulcata*, *Sargassum binderi* и *Turbinaria conoides* обладали более высокой ингибирующей активностью по отношению к дипептидилпептидазе-4 (фермент семейства сериновых пептидаз — DPP-4), стимулировали секрецию глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP) [18] и глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), а также значительно интенсивнее снижали уровень глюкозы в сыворотке крови, массу печени и уровень ТГ, чем экстракт из зелёной водоросли *H. macroloba*. Кроме того, все экстракты положительно действовали на антиоксидантный статус, ингибировали процесс перекисного окисления липидов (уменьшалось содержание СОД в печени и скелетных мышцах), увеличивали содержание гликогена в печени и в скелетных мышцах [19].

Высокую оценку действию экстрактов водорослей при СД-2 дают в своём очень содержательном обзоре Y. Sharafuddin и соавт. [20], подробно излагающие свою точку зрения на механизмы их действия. В перечень эффектов экстрактов водорослей при диабете они включили ингибирование активности ферментов альдореуктазы, протеин-тирозин-фосфатазы 1β и дипептидилпептидазы-4, противовоспалительное действие, индукцию антиоксидантных ферментов в печени, стимуляцию транспорта глюкозы и инкретиновых гормонов, а также защиту β -клеток поджелудочной железы.

Интересные и перспективные исследования антидиабетического действия водно-этанольного экстракта бурой водоросли *S. oligocystum* в дозах 150 и 300 мг/кг у крыс с экспериментальным диабетом, вызванным стрептозотацином (60 мг/кг), проведены S. Akbarzadeh и соавт. [21]. Через месяц ежедневного приёма экстракта определяли уровень глюкозы, ОХ, ТГ, ЛПВП и ЛПНП в сыворотке крови, оценивали инсулинорезистентность, функцию β -клеток, а также исследовали гистопатологию поджелудочной железы. У крыс, получавших экстракт водоросли, был снижен уровень сывороточной глюкозы, а также показатель НОМА-IR (показатель, характеризующий инсулинорезистентность), повышен уровень НОМА-В (показатель, характеризующий функцию β -клеток) по сравнению с контролем (животные, не получавшие экстракт). Увеличение индекса НОМА-В и благоприятные гистологические изменения в поджелудочной железе указывают на положительное влияние экстракта на пролиферацию β -клеток у крыс с диабетом. У крыс, получавших экстракт в дозе 300 мг/кг, наблюдалась значительная регенерация β -клеток поджелудочной железы, увеличение количества и площади островков Лангерганса, в то время как у контрольных животных с экспериментальным диабетом имела место дегенерация островков.

Уровень ТГ сыворотки крови у животных, получавших экстракт, снижался по сравнению с контрольными животными. Поскольку в развитии диабета играет значительную роль окислительный стресс, что приводит к перекисному окислению липидов, разрывам ДНК и окислению белка, действие экстракта на липидный обмен, в частности, на уровень ТГ, может быть связано с наличием в нём компонентов с антиоксидантными свойствами. Авторы связывают защитное действие экстракта с наличием в нём полифенолов. Опираясь на результаты, полученные другими учёными, авторы не исключают, что эффект экстракта связан и с наличием в нём полисахаридов.

Хорошо известна связь между окислительным стрессом и гипергликемией. Окислительный стресс считается ключевым механизмом токсического действия глюкозы в β -клетках поджелудочной железы. Антиоксидантные эффекты экстрактов водорослей и их отдельных метаболитов описаны в многочисленных работах, в связи с чем мы на этом не останавливаемся. В последние годы появляется всё больше исследований, касающихся антиоксидантного действия экстрактов водорослей на окислительный стресс при диабете [22, 23]. В работах обращается внимание на то, что экстракты, полученные разными методами, уменьшают уровень компонентов окислительного стресса и стимулируют синтез антиоксидантных ферментов.

Таким образом, как следует из многочисленных литературных источников, экстракты большинства морских водорослей достаточно эффективны в качестве вспомогательных средств для коррекции углеводного обмена, а их получение, несмотря на трудности в стандартизации, обходится значительно дешевле, чем индивидуальных БАВ. Однако все авторы отмечают необходимость исследования химического состава экстрактов для определения действующего начала в каждом конкретном случае.

Достаточно много исследований проведено с индивидуальными веществами, полученными из различных видов водорослей — полисахаридами, полифенолами и пр.

Полисахариды

Полисахариды морских водорослей являются сложными по структуре соединениями, поскольку содержат различные функциональные группы. Их относят к «поливалентным биомодуляторам», так как они обладают широким спектром биологической активности. Все эти свойства делают возможным использование этих соединений в качестве профилактических или лечебных противодиабетических агентов с разными механизмами действия.

Весьма перспективными являются результаты, полученные при исследовании антидиабети-

ческих свойств фукоиданов — сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей. Они свидетельствуют о том, насколько активность полисахаридов зависит от вида водоросли и сезона её сбора.

Так, в работе К.Т. Kim и соавт. [24] установлено, что образцы фукоиданов с М.м. 5 kDa, 5-30 kDa, полученные из водорослей *Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum*, при пероральном применении значимо снижали содержание глюкозы в крови мышей с экспериментальным СД-2. Фукоиданы по-разному ингибировали α -глюкозидазу — в зависимости от водоросли, из которой были получены, и сезона сбора гидробионтов. Фукоидан из *A.nodosum* был более мощным ингибитором активности фермента (IC_{50} — от 0,013 до 0,047 мг/мл), чем полисахарид из *F.vesiculosus* (IC_{50} — 0,049 мг/мл). Фукоидан из водоросли *A.nodosum* значимо (на 7–100% в зависимости от сезона сбора этого гидробионта) снижал также активность α -амилазы.

Дозо- и время-зависимая стимуляция секреции инсулина фукоиданом, полученным из бурой водоросли *F.vesiculosus*, была показана в системе *in vitro* на культуре клеток поджелудочной железы RIN-5F, при этом глибенкламид (сахароснижающий лекарственный препарат) не отменял действия фукоидана. Одновременно увеличивалась и концентрация аденозинмонофосфата [25]. Эти же авторы также показали увеличение секреции инсулина и уменьшение уровня глюкозы в крови крыс GK под действием полисахарида. Обработка клеток RIN-5F ингибитором аденилциклазы, снижающей образование сАМР, значительно уменьшала фукоидан-индуцированную секрецию инсулина, что свидетельствует о возможности стимуляции фукоиданом секреции инсулина и участии этого полисахарида в защите поджелудочной железы через сАМР сигнальный путь *in vivo* и *in vitro*.

Выделенный из бурой водоросли *S.wightii* новый сульфатированный полигалактопиранозил-фукопиранан (СПФ), имеющий структуру: $\rightarrow 1)-\alpha$ -Fucp-(2SO₃-)-(3 $\rightarrow$ 1)- α -Fucp-(2SO₃-)-(4 $\rightarrow$ 1)- β -Galp-(4 $\rightarrow$ 1)- β -Galp-, оказывал выраженное многостороннее действие [26]. С использованием структурных и химических методов показано, что цепь этого галактофукана, построена из (1 $\rightarrow$ 3)-связанных α -фукопиранозных звеньев, сульфатированных при С-2 и ацетилированных при С-4 и (1 $\rightarrow$ 4)-связанных остатков β -галактопиранозы.

Авторами проведено исследование фармакологических свойств СПФ, включая антиоксидантную, противовоспалительную, антидиабетическую и гипотензивную активности с использованием различных моделей *in vitro*. Сульфатированный полигалактопиранозил-фукопиранан связывал радикалы DPPH, ABTS + и Fe²⁺ (IC_{90} ~ 1 мг/мл). СПФ проявил более высокую селективную противовоспалительную активность в отно-

шении индуцированного провоспалительного фермента СОХ-2, чем в отношении конститутивного фермента СОХ-1. Он обладал также сильным ингибирующим действием на липоксигеназу-5 (СОХ-5, IC_{90} составила 1,02 мг/мл). Исследуемый полисахарид продемонстрировал значительно более высокие ($p < 0,05$) антидиабетические свойства в отношении α -амилазы (IC_{90} — 0,93 мг/мл) и α -глюкозидазы (IC_{90} — 1,48 мг/мл) по сравнению с антидиабетическими агентами акарбозой и дипротеином-А, а также обладал сильным ингибирующим действием на фермент дипептидилпептидазу-4 (IC_{90} — 0,11 мг/мл). Кроме того, СПФ проявлял антигипертензивную активность, путём воздействия на ангиотензинпревращающий фермент (IC_{90} — 0,2 мг/мл).

Таким образом, ранее не описанный СПФ авторы позиционируют как потенциальное противовоспалительное антидиабетическое, антигипертензивное средство (против диабета 2 типа), а также как природный антиоксидант.

В качестве антидиабетических соединений могут рассматриваться СПС не только из бурых, но и из других видов водорослей. W. Lin и соавт. [27] экспериментально обосновали гипогликемическое действие полисахарида из зелёной водоросли *Enteromorpha prolifera* (РЕР). В частности, авторы исследовали его действие на метаболизм глюкозы у крыс с экспериментальным диабетом. Полисахаридные компоненты этой водоросли представлены растворимыми сульфатированными гетерополисахаридами, обладающими многими полезными свойствами — антибактериальным, противовоспалительным, антиоксидантным, иммуномодулирующим, липидрегулирующим [28]. Полисахарид из этой водоросли (РЕР) на DEAE-целлюлозе был разделён на 4 компонента. Основным был компонент РЕР-2, содержащий 53,2% полисахаридов, 18,6% сульфатных групп, 11,5% белков и 12,4% урановых кислот. Анализ моносахаридного состава полисахаридов РЕР-2 показал, что он построен из рамнозы, глюкуроновой кислоты, арабинозы, фукозы, ксилозы и глюкозы (5,12:1,32:3,38:1,62:1:1,03, соответственно). Полисахарид в течение 4 нед. вводили внутривенно крысам с экспериментальным диабетом. По окончании лечения уровень глюкозы у животных, получавших РЕР (опытная группа), был ниже, чем у животных, получавших метморфин, и у нелеченных крыс (модель диабета).

В исследовании W. Lin и соавт. [27] показано, что полисахарид из *E.prolifera* (РЕР) в средней дозе (300 мг/кг) способен снижать уровень глюкозы в крови крыс с СД и значительно улучшать толерантность к глюкозе, что сопоставимо с результатами применения лекарственного препарата метморфина. Световая микроскопия позволила уста-

новить отсутствие изменений в поджелудочной железе интактных крыс. В модельной группе (экспериментальный диабет) объём островков был значительно уменьшен, отмечались конденсация ядер клеток, уменьшенные размеры цитоплазмы, атрофия и слабая окрашенность большинства островковых клеток. Наблюдалась обширная лимфоцитарная инфильтрация. В группе животных, получавших метморфин, морфологические изменения были не такими выраженными, как в модельной группе. В группах крыс, получавших разные дозы РЕР, количество островков и β -клеток поджелудочной железы было значительно увеличено, морфология и структура органа были, в основном, нормальными, цитоплазма — гомогенной, лимфоцитарная инфильтрация не регистрировалась. Все эти наблюдения свидетельствовали о том, что полисахарид из зелёной водоросли *E.prolifera* может рассматриваться как потенциальное антидиабетическое средство.

Через 4 нед. после окончания цикла ежедневного внутрижелудочного введения полисахарида крысам с экспериментальным диабетом в сыворотке крови значительно снизился уровень малонового диальдегида, а активность супероксиддисмутазы (ключевого внутриклеточного антиоксиданта, удаляющего супероксидные анионные радикалы в организме) и глутатионпероксидазы (акцептора, сохраняющего структуру и целостность мембраны путём снижения уровня перекиси водорода и гидропероксидов липидов) возросла по сравнению с контрольной группой.

Кроме того, было установлено, что у крыс, получивших полисахарид, наблюдался более высокий уровень экспрессии мРНК глюкокиназы — гликолитического фермента, катализирующего фосфорилирование (превращение) глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Снижение экспрессии этого фермента подавляет утилизацию глюкозы в печени и снижает секрецию инсулина из β -клеток островков поджелудочной железы. Усиление экспрессии гена глюкокиназы может оказывать терапевтическое воздействие на СД, что подтверждают исследования W. Lin и соавт. [27].

В наших исследованиях при изучении влияния фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на систему ПОЛ-АОЗ в печени мышей с экспериментальной гиперлипидемией установлено, что под действием полисахарида у животных наблюдалось восстановление показателей ПОЛ: содержание диеновых конъюгатов снижалось на 39,6% ($p < 0,01$), малонового диальдегида — на 48,3%, ($p < 0,01$). Коррекция окислительного стресса фукоиданом сопровождалась увеличением уровня глутатионпероксидазы на 28,5% ($p < 0,05$) и глутатионредуктазы — на 59,7% ($p < 0,01$), однако эти показатели не достигали величин, характерных для животных контрольной

группы. Что касается каталазы и супероксиддисмутазы, то их уровень восстанавливался под влиянием фукоидана до контрольных значений [29].

Большое количество работ посвящено сульфатированным полисахаридам водорослей и, в частности фукоиданам, как ингибиторам α -глюкозидазы, α -амилазы и других ферментов [30].

Уровень α -амилаза-ингибирующей активности полисахаридов зависит от вида водоросли. Так, в работе К.Т. Kim и соавт. [24] установлено, что фукоидан из водоросли *Ascophyllum nodosum* снижал α -амилазную активность ($IC_{50}=0,013-0,049$ мг/мл), тогда как полисахарид из *Fucus vesiculosus* не подавлял активность этого фермента.

Т. V. Kumar и соавт. [31] исследовали действие фукоидана из бурой водоросли *S.wightii* на активность α -глюкозидазы. Полисахарид был получен после экстракции этанолом и ацетоном и осаждения $CaCl_2$. Фукоидан содержал $53 \pm 0,52\%$ фукозы и $36 \pm 0,60\%$ сульфата. При концентрациях 31,25; 62,5; 125 и 250 мкг полисахарид подавлял активность α -глюкозидазы на 19; 31; 38 и 71%, соответственно, при IC_{50} , составляющей 132,9 мкг, т. е. он был активнее акарбозы (IC_{50} составила 1 мг).

Авторы, в целом оценивая полученные результаты, отмечают, что фукоидан может быть использован в качестве биологической добавки к пище или компонента при создании новых лекарственных средств, направленных на регулирование активности пищеварительных ферментов при лечении сахарного диабета. При этом авторы обращают внимание на тот факт, что фукоидан из водоросли *S.wightii* был более эффективен в качестве ингибитора α -глюкозидазы, чем акарбоза.

На модели экспериментального СД-2 у крыс линии Goto-Kakizaki, показано, что низкомолекулярный фукоидан из бурой водоросли *S.japonica* уменьшает выраженность эндотелиальной дисфункции, характеризующейся нарушением биодоступности iNOS и NO. По сравнению с пробуждением, полисахарид в большей степени способствовал снижению гипертензии, устранял повреждения эндотелия аорты, мезентериальных и бедренных артерий, а экспрессия iNOS и продукция NO подвергались обратному развитию. Авторы считают, что фукоидан является потенциальным кандидатом в лекарственные препараты для защиты эндотелия при кардиоваскулярных изменениях, сопровождающих диабет [32].

Действие фукоидана из водоросли *Sargassum hemiphyllum* на β -клетки поджелудочной железы линии NIT-1, предварительно обработанные стрептозотацином, было исследовано W. C. Yu и соавт. [33]. Если в контроле (без фукоидана) имело место усиление апоптоза β -клеток и снижение секреции инсулина, то в присутствии полисахарида явления апоптоза уменьшились и повысилась секреция инсулина, усилилась экспрессия рецепторов

глюкагоноподобного пептида GPP-1R, вырабатывающегося на приёмы пищи и стимулирующего продукцию инсулина, и сиртуина-1 путём активации каскада AMPK/GPDH/PDX-1 в β -клетках.

СПС красных водорослей (каррагинаны) также оказывают антидиабетическое действие, в частности, путём ингибирования активности α -глюкозидазы [34]. Авторы сравнивали этот эффект у каррагинана из *Kappaphycus alvarezii* и коммерческого препарата. В составе обоих препаратов присутствовали алкалоиды, сапонины, стероиды, и углеводы. Оба препарата оказывали ингибирующее действие на активность α -глюкозидазы с максимальными показателями $74,49 \pm 1,05\%$ и $67,42 \pm 0,63\%$.

Сульфатированные полисахариды оказывают положительное действие и при осложнениях, сопровождающих СД-2.

Диабетическая ретинопатия известна как специфическое тяжёлое патологическое изменение сетчатки глаза на фоне длительно текущего и плохо контролируемого сахарного диабета [35]. Вследствие длительной гипергликемии на сетчатке происходит образование микроаневризм [36]. В исследованиях М. С. Chen и соавт. [37] установлено, что фукоидан может ингибировать сигнальный путь PI3K/AKT, приводящий к стимуляции экспрессии HIF-1, который является важным регулятором ангиогенеза, а согласно данным М. Narazaki и соавт. [38], полисахарид уменьшает экспрессию VEGF-рецепторов и, более того, VEGF-корцепторов нейропилина.

Ряд работ показывает, что фукоидан снижает также секрецию VEGF в пигментном эпителии сетчатки [39] и неоваскуляризацию последней [40]. Следует отметить тот факт, что степень воздействия фукоидана на секрецию VEGF зависит от молекулярной массы, концентрации фукоидана, степени сульфатирования и источника выделения [41].

При диабетической ретинопатии фукоидан может оказывать положительное действие в качестве антиоксиданта, удаляющего из организма супероксидные радикалы. Однако пока ещё мало известно о роли его антиоксидантного действия в клетках органа зрения. Есть данные, что полисахарид оказывал защитное действие на клетках ARPE19 (клеточная линия пигментного эпителия сетчатки человека) от оксидативного стресса, образования реактивных форм кислорода, вызванного воздействием высокой концентрации глюкозы [42].

Фукоиданы оказывают влияние и на макрофаги, вовлечённые в патогенез диабетической ретинопатии. Так, в работе Н. Y. Park и соавт. [43] установлено, что фукоидан из бурой водоросли *F. vesiculosus* уменьшает активацию NF- κ B и MAPK JNK, ERK1/2 и p38 путей, а также экспрессию iNOS, COX2 и хемотаксического фактора MCP-1. Аналогичные результаты были получены с фукои-

даном из водоросли *Ecklonia cava*. Напротив, фукоидан, полученный из водоросли *Laminaria angustata*, активировал макрофаги и синтез ими TNF α и IL-6 [44]. Фукоиданы с М. м. 100–130 kDa предотвращали VEGF-индуцированное фосфорилирование VEGFR2, по-видимому, за счёт нарушения связывания VEGF с мишенью.

Таким образом, анализ литературы последних лет показывает, что фукоиданы могут в дальнейшем стать перспективным средством для терапии диабетической ретинопатии.

Диабетическая кардиомиопатия при сахарном диабете, проявляется широким спектром биохимических и структурных нарушений со стороны сердечно-сосудистой системы, которые приводят к развитию систолической и диастолической дисфункции, а в итоге — к хронической сердечной недостаточности. Основной причиной диабетической кардиомиопатии является нарушение окислительно-восстановительных реакций вследствие недостаточного поступления энергетических субстратов в условиях гипергликемии.

Исследования Х. Yu и соавт. [45] показали эффективность низкомолекулярного фукоидана из бурой водоросли *S. japonica* (М. м. 7000 Da, содержание фукозы, урсоновой кислоты и сульфата составило 29,5; 7,5 и 30,1%) при СД у крыс линии Goto–Kakizaki. У крыс, получавших фукоидан в течение 3 мес. по 50 или 100 мг/кг в день, регистрировалось подавление активности супероксиддисмутазы в сердечной мышце, ингибирование образования активных форм кислорода и уменьшение апоптоза кардиомиоцитов. Кроме того, имело место снижение экспрессии протеинкиназы β (PKC β) — активного участника окислительного стресса в кардиомиоцитах под действием глюкозы. Полученные данные свидетельствуют о том, что низкомолекулярный фукоидан обладает протективным эффектом при диабетической кардиомиопатии за счёт уменьшения PKC β и снижения уровня апоптоза кардиомиоцитов.

Диабетическая нефропатия — одно из наиболее серьёзных микрососудистых осложнений сахарного диабета [46]. Фукоидан может задерживать прогрессирование диабетических почечных осложнений. Об этом свидетельствуют результаты исследований J. Wang и соавт. [47]. При экспериментальном СД-2 на крысах линии Goto–Kakizaki (опыт) и Vistar (контроль) установили, что по сравнению с контролем у опытных животных, получавших фукоидан из *S. japonica* в течение 13 нед. *per os*, уменьшилось содержание глюкозы в крови, нормализовался уровень мочевины, сывороточного креатинина, белка в моче и коллагена IV в корковом слое почек. Кроме того, снизилась экспрессия TGF- β 1 и фибронектина в корковом слое, а также фактора NF- κ B в гломерулярных мезангиальных клетках почек. Экспе-

рименты, проведённые *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о том, что фукоидан ослабляет гипергликемию, препятствует развитию нефропатии при спонтанном диабете, что связано со снижением активации NF- κ B — сигнального пути.

Протективное действие низкомолекулярного фукоидана, полученного из водоросли *S. japonica* Y. Xu и соавт. [48] объясняют способностью полисахарида ингибировать уровень Р-селектина и селектинзависимых провоспалительных цитокинов. На модели сахарного диабета, вызванного стрептозотоцином, авторы показали, что у животных с экспериментальным диабетом, получавших низкомолекулярный фукоидан, сохранялась нормальная структура почки и уменьшалась инфильтрация органа воспалительными клетками. Авторы позиционируют низкомолекулярный фукоидан как перспективное лекарственное средство при диабетической нефропатии.

Хорошие результаты получены R.B.A. Kolsi и соавт. [49], получившими нефро- и гепатопротекторный эффект фукоидана, полученного из бурой водоросли *Sargassum vulgare* при экспериментальном диабете, вызванном аллоксаном. Кроме того, полисахарид снижал уровень тощачевой и постпрандиальной глюкозы, ингибировал активность α -амилазы, улучшал параметры гемограммы, снижал интенсивность окислительного стресса, улучшал патоморфологическую картину поджелудочной железы.

Антидиабетическим потенциалом обладают не только СПС, но и альгинаты [50, 51]. В связи с этим представляют интерес исследования Hardoko и соавт. [50], которые устанавливали антидиабетические эффекты фракций ламинарана, фукоидана и альгиновой кислоты из бурых водорослей *Sargassum duplicatum* и *Turbinaria decurrens*. Все фракции обладали однонаправленной ингибирующей активностью по отношению к α -глюкозидазе. Более высокую активность проявила ламинарановая фракция. По степени ингибирования фракции распределились следующим образом: ламинарановая фракция из *S. duplicatum* (IC₅₀ — 36,13 м.д.) → ламинаран из *T. decurrens* (IC₅₀ — 44,48 м.д. → фукоидан из *T. decurrens* (IC₅₀ — 63,39 ч/млн) → фукоидан из *S. duplicatum* (IC₅₀ — 75,10 ч/млн) → альгиновые фракции. По мнению авторов, ламинарановая и фукоидановая фракции могут снижать содержание глюкозы в крови не только при СД-2, но и при СД-1, что даёт основание предполагать возможность использования полисахаридов водорослей в качестве основы для создания противодиабетических средств.

Если предыдущие авторы не получили значительного эффекта от применения альгинатных фракций исследованных ими водорослей, то K. F. Sani [52] показали, что альгинатные фракции бурой водоросли *Sargassum hystrix* способны снижать уровень глюкозы в сыворотке крови. Возможно, это связано с высоким

содержанием в альгинате блоков, построенных из гиалуроновой кислоты. Следует отметить, что структурные характеристики альгинатов, полученных из различных источников, отличаются. Однако часто авторы не приводят информацию по структурам исследуемых полисахаридов, что значительно затрудняет интерпретацию полученных результатов.

Было исследовано также влияние альгината натрия из водорослей *Turbinaria ornata* и *Sargassum crassifolium* на уровни глюкозы и липидов в крови у крыс с аллоксановым диабетом. Введение животным альгината натрия [52] приводило к снижению уровня глюкозы в крови с 208,57±70,60 мг/дл (диабетические крысы) до 96,55±15,65 мг/дл (крысы, получавшие альгинат в дозе 400 мг/кг). Увеличение дозы альгината не изменяло результата. Альгинат из водоросли *S. crassifolium* снижал уровень глюкозы у животных с диабетом до 275,66±34,61 мг/дл (в контрольной группе — 568,82 мг/дл) [52]. Одновременно полисахариды из обеих водорослей снижали уровень общего холестерина, повышали уровень ХС-ЛПВП и снижали уровень ХС-ЛПНП в зависимости от дозы.

Отмеченные различия, возможно, объясняются тем, что авторы работали с разными водорослями, собранными в различных регионах земного шара. Известно, что содержание полисахаридов водорослей и их структурные характеристики зависят от места и сезона сбора гидробионтов.

Приведённые материалы свидетельствуют о перспективности исследований, связанных с антидиабетическими свойствами полисахаридов водорослей, которые могут в дальнейшем стать основой для создания новых лекарственных средств против СД-2, биологических добавок к пище и продуктов функционального питания.

Полифенолы

Преобладающими в бурых водорослях БАВ, отвечающими за большую часть их биологической активности, являются полифенолы. Флоротаннины — высокогидрофильные соединения с широким диапазоном М. м. от 126 до 650 kDa, представляющие собой продукты полимеризации флороглюцина, встречаются только в бурых водорослях. Эти высокогидрофильные соединения с широким диапазоном М. м. от 126 до 650 kDa состоят, главным образом, из флоротаннинов — продуктов полимеризации флороглюцина [53, 54].

Почти все фенольные соединения являются активными метаболитами клеточного обмена и играют существенную роль в различных физиологических процессах организма (дыхании, фотосинтезе, росте, развитии и репродукции) [55]. Флоротаннины обладают гепатопротекторным, липидкорректирующим, противовоспалительным и противоопухолевым действием, являются силь-

нейшими антиоксидантами. Антиоксидантная активность этих соединений в 2–10 раз выше, чем у аскорбиновой кислоты и токоферола [55, 56].

Наиболее высокое содержание полифенольных соединений характерно для бурых водорослей [56, 57]. В сухой массе водорослей флоротаннины составляют около 15% [54].

Флоротаннины делятся на 4 класса [54]:

- фугалолы и флоретолы (флоротаннины с эфирной связью);
- фуколы (флоротаннины с фенильной связью);
- фукофлоретолы (флоротаннины с эфирной и фенильной связью);
- эколы и кармалолы (флоротаннины с дибензодиоксиновой связью).

Эпидемиологические, клинические и диетологические исследования убедительно подтверждают, что фенолы пищи играют важную роль в поддержании здоровья человека. Регулярное употребление этих соединений уменьшает риск возникновения различных хронических заболеваний, включая рак, метаболические и нейродегенеративные процессы [58].

В литературе последних лет достаточно много экспериментальных работ, посвящённых антидиабетическому действию флоротаннинов [49, 59, 60].

Описано ингибирующее действие метанольного экстракта водоросли *Ecklonia stolonifera* с высоким (около 30%) содержанием полифенолов на активность α -амилазы [61]. В качестве модели была использована линия мышей КК-Ау, в организме у которых присутствуют ген ожирения и диабетический ген. У таких животных имеет место ожирение и диабет (нарушение толерантности к глюкозе, гипергликемия, гиперинсулинемия, нефропатия). Экстракт водоросли (содержание в композиции диеты до 1%) снижал уровень глюкозы в крови животных после 4-недельного кормления, а также значимо ингибировал α -амилазу.

Антиоксидантные свойства фенольных соединений морских водорослей могут противодействовать токсическому действию конечных продуктов гликирования, например, при диабетической нефропатии, ретинопатии, катаракте, нейропатии и пр. Эти выводы подтверждены недавними исследованиями [62], где показано, что полифенол из водоросли *Ishige foliacea* оказывал защитное действие на клетки линии НЕК из эмбриональной почки человека от действия высокой концентрации высокоактивного карбонильного метаболита глюкозы. В работе S. H. Lee и соавт. [63] показано, что октафлорэтол из водоросли *I.foliacea* и диэкол из водоросли *E.cava* повышают активность антиоксидантных ферментов — каталазы, СОД и ГПО, что может в определённой степени объяснять защитные эффекты этих соединений от действия на β -клетки линии RINm5F от высоких концентраций глюкозы.

В работе T. Jupudi и соавт. [59] представлены результаты исследования антиоксидантной активности водно-ацетонового экстракта (3:7) бурой водоросли *Sargassum ilicifolium*.

Флоротаннин, содержащийся в экстракте, при дозе 1000 мкг/мл проявил себя как мощный антиоксидант и ингибитор α -амилазы ($90,703 \pm 0,45\%$) и α -глюкозидазы ($90,9 \pm 0,28\%$). В качестве положительного контроля был использован официальный препарат акарбоза. Действие экстракта оказалось сопоставимо с действием акарбозы: ингибирование α -амилазы акарбозой (1000 мкг/мл) происходило на $91,593 \pm 0,415\%$; α -глюкозидазы — $93,383 \pm 0,405$ мкг/мл.

Эти авторы, как и ряд других, обращают внимание на необходимость глубоких исследований механизмов действия флоротаннинов при СД-2.

При использовании фракции полифенолов (содержание полифенолов 70% от навески), полученной из этанольного экстракта лиминариев водоросли *Ecklonia kurome Okamura* (КРР), была установлена сильная селективная ингибирующая активность в отношении α -амилазы. Концентрации КРР, которые давали 50% ингибирование (IC_{50}) сахарозы, мальтазы и α -амилазы составляли, соответственно, 761, 1882 и 16 мкг/мл. Официальные препараты акарбоза и воглибоза проявляли активность в отношении сахарозы и мальтазы [64]. Известно, что полифенолы — ингибиторы α -амилазы и α -глюкозидазы — снижают постпрандиальное повышение глюкозы в плазме крови [65]. В экспериментах Н. L. Ху и соавт. [64] уровень глюкозы в крови мышей, получавших КРР, значительно снижался через 2 ч. после введения глюкозы. К концу эксперимента падал и уровень инсулина, а также фруктозамина и гликоальбумина по сравнению с животными контрольной группы. Наблюдалось уменьшение симптоматики со стороны почек, что свидетельствует о возможности предотвращения диабетической нефропатии при помощи КРР.

Известно действие различных флоротаннинов на активность протеин-тирозин-фосфатазы (РТР1В) — фермента, действующего в качестве негативного регулятора передачи сигналов инсулина и находящегося в мембранах эндоплазматического ретикулума печени, мышц, жировой ткани [66]. Это свидетельствует о потенциальной пользе применения их при диабете в качестве средств, улучшающих чувствительность к инсулину.

Сообщалось, что коммерческий препарат 2,7"-флороглюцинол-6,6-биекол из водоросли *E.cava* обладает способностью защищать клетки инсулиомы крысы, а также клеточной линии поджелудочной железы INS-1 от апоптоза, вызванного воздействием высокой концентрации глюкозы [67]. Обработка клеток этим соединением в дозах 10–100 мкМ значительно снижала токсиче-

ское действие высокой концентрации глюкозы (на 22,4%) и повышала жизнеспособность клеток до 89,9% по сравнению с контролем. При этом дозозависимо снижались уровень реактивных форм кислорода, перекисное окисление липидов и содержание оксида азота в клетках. Кроме того, уменьшалось содержание проапоптотического белка Вах, каспазы 3 и 9, а также повышался уровень антиапоптотических белка Bcl-2.

В экспериментах *in vivo* на рыбках-данио было показано, что диэкол, полученный из бурой водоросли *E.cava*, оказывает противодиабетический эффект, снижая уровень глюкозы в крови, что связано с улучшением метаболизма глюкозы в печени. В ответ на применение этого соединения улучшалось также поглощение глюкозы мышечными тканями, что авторы [68] связывают со стимуляцией мышечных путей PI3k-Akt, которые ингибируются в условиях резистентности к инсулину. Диэкол оказывал влияние и на жировой обмен у мышей, находившихся на диете с высоким содержанием жира. У этих животных уменьшались масса тела и количество жировой ткани, снижался уровень ХС ЛПНП на 55%. Диэкол регулировал экспрессию ранних адипогенных генов в 3T3-L1 клетках, что приводило к подавлению поздних адипогенных факторов и снижению ТГ в этих клетках.

Протеин-тирозинфосфатаза 1В (PTP1B) негативно регулирует пути передачи сигналов инсулина и играет важную роль при СД-2, так как его гиперэкспрессия может вызвать резистентность к инсулину, т.е. этот фермент может быть терапевтической мишенью как при СД-2, так и при ожирении [69]. Как основной компонент водорослей бромфенолы могут быть ответственными за антидиабетическую активность этих гидробионтов.

Бромфенолы, выделенные из красных водорослей *Rhodomela confervoides*, оказывают *in vitro* выраженное влияние на уровень PTP1B, при этом значения IC₅₀ находятся между 0,8 мкМ и 2,4 мкМ [70]. Такие же результаты получены с бромфенолами из другой красной водоросли *Symphyocladia latiuscula* (IC₅₀ — от 2,7 до 4,3 мкМ).

Некоторые бромфенолы оказывают ингибирующий эффект на альдоредуктазу — основной фермент полиольного пути, контролирующей образование сорбита из глюкозы и играющий важную роль в дегенеративных осложнениях, возникающих при развитии диабета.

В литературе последних лет мало работ, касающихся исследования эффективности полифенолов водорослей при диабете у людей. В статье S. H. Lee, Y. J. Jeon [71] приводятся результаты исследования эффективности применения экстракта бурой водоросли *E.cava*, богатого диэколом, у лиц (80 человек) с преддиабетом (повышенный уровень глюкозы в плазме натощак), по-

лучавших экстракт в течение 12 нед. по 1500 мг в день. Исследование было рандомизированным двойным слепым плацебо-контролируемым. По сравнению с пациентами группы, принимавшей плацебо, у лиц, получавших экстракт, отмечалось значительное снижение уровня глюкозы после приёма пищи и резистентности к инсулину.

Полифенолы морских водорослей являются перспективными соединениями для лечения СД-2, что подтверждено в исследованиях *in vivo* и *in vitro*. Однако исследования по определению их антидиабетического действия на людях единичны. Следует также учитывать структурное многообразие полифенолов и то, что доза препарата для пациентов может быть гораздо выше, поскольку включается действие пищеварительных ферментов человека. Таким образом, исследования роли полифенолов в профилактике и терапии СД-2 требуют продолжения и систематизации.

Заключение

Как следует из приведённых материалов, экстракты, полисахариды и полифенолы, полученные из морских водорослей, являются перспективными антигипергликемическими средствами. Высокая терапевтическая эффективность экстрактов водорослей обусловлена гармоничным сочетанием и взаимодействием широкого спектра БАВ (полисахариды, флавоноиды, пектины и пр.) в их составе, что способствует усилению фармакологических свойств каждого входящего ингредиента и соответствует поливалентности патогенеза заболевания. Что касается СПС, то их многокомпонентное действие при СД-2 обусловлено тем, что отдельные участки полисульфатированных цепей фукоиданов способны выступать в качестве миметиков природных лигандов белковых рецепторов, относящихся к гликозаминогликану [72], в связи с чем их называют поливалентными биорегуляторами.

Большинство авторов позиционируют полисахариды, полифенолы и экстракты морских водорослей в качестве потенциальных лекарственных препаратов, компонентов БАД к пище и продуктов функционального питания. Следует отметить, что основная часть исследований проводится в эксперименте, поскольку до сих пор существуют трудности в стандартизации химической структуры и состава СПС, и полифенолов, выделенных из таких уникальных биологических объектов, как водоросли. Антигипергликемические эффекты этих биополимеров у пациентов только начинают исследоваться [29].

В последнее время учёные Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН получили с использованием ферментов фукоидан из бурой водоросли *F.evanescent*, структура которого является стандартной [73].

Поскольку запасы этой водоросли в Дальневосточных морях России значительны, она является промышленным объектом, а выход фукоидана из неё более высокий, чем из других видов водорослей, этот полисахарид может быть рекомендован для разработки антидиабетического препарата.

Представленные материалы свидетельствуют о том, что дальнейшие исследования механизмов действия сульфатированных полисахаридов при СД-2 позволят расширить ассортимент безвредных полифункциональных антидиабетических

средств, которые снижают уровень глюкозы в крови, уменьшают инсулинорезистентность периферических тканей и степень потери массы тела, ингибируют перекисное окисление липидов, активируют систему антиоксидантной защиты, предохраняют β -клетки поджелудочной железы от повреждения, являются ингибиторами α -глюкозидазы и α -амилазы. Это открывает перспективы создания на их основе или на основе их структурных аналогов лекарственных препаратов нового поколения.

ЛИТЕРАТУРА

1. IDF diabetes atlas. 7th ed. International Diabetes Federation; Brussels, Belgium: 2015 [accessed Aug 2016]. <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>.
2. Gotama T.L., Husni A., Ustadi. Antidiabetic activity of *Sargassum hystrix* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Prev. Nutr Food Sci* 2018; 23 (3): 189–195.
3. Fitton J.H., Stringer D.N., Kerpiniak S.S. Therapies from fucoidan: an update. *Mar. Drugs* 2015; 13: 5920–5946.
4. Аметов А.С., Соловьева О.Л. Окислительный стресс при сахарном диабете 2-го типа и пути его коррекции. *Пробл. эндокринологии*. — 2011. — № 6. — С. 52–56. / *Ametov A.S., Solov'eva O.L. Okislitel'nyy stress pri sakharomom diabete 2-go tipa i puti ego korrektsii. Probl. endokrinologii* 2011; 6: 52–56. [in Russian]
5. Балаболкин М.И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете. *Сахарный диабет*. — 2002. — № 4. — С. 5–16. / *Balabolkin M.I. Rol' glikirovaniya belkov, okislitel'nogo stressa v patogeneze sosudistyykh oslozhneniy pri sakharomom diabete. Sakharный диабет* 2002; 4: 5–16. [in Russian]
6. Pasaoglu H., Sancak B., Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J. Exp. Med.* 2004; 203 (3): 211–218.
7. Zou C., Hu H. Use of pioglitazone in the treatment of diabetes: effect on cardiovascular risk. *Vascular Health and Risk Management* 2013; 9 (1): 429–433.
8. Oh J.-H., Kim J., Lee Y. Anti-inflammatory and anti-diabetic effects of brown seaweeds in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrition Research and Practice* 2016; 15: pISSN 1976-1457 eISSN 2005-6168.
9. Kang S.I., Kim M.H., Shin H.S., Kim H.M., Hong Y.S., Park J.G., Lee N.H., Chung W.S., Kim S.J. A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem* 2010; 21: 1251–1257.
10. Mohapatra L., Bhattacharya S.K., Panigrahy R., et al. Antidiabetic effect of *Sargassum wightii* and *Ulva fasciata* in high fat diet and multi low dose streptozotocin induced type 2 diabetic mice. *UK J. of Pharmaceutical and Biosciences* 2016; 4 (2): 13–23.
11. Аметов А.С., Пуговкина Я.В., Черникова Н.А. Гомеостаз глюкозы у здорового человека в различных условиях. Современный взгляд. *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. — 2016. — № 1. — С. 45–55. / *Ametov A.S., Pugovkina Ya.V., Chernikova N.A. Gomeostaz glyukozy u zdorovogo cheloveka v razlichnykh usloviyakh. Sovremennyy vzglyad. Endokrinologiya: novosti, mneniya, obucheniye* 2016; 1: 45–55. [in Russian]
12. Kang S.Y., Kim E., Kang I., Lee M., Lee Y. Anti-diabetic effects and anti-inflammatory effects of *Laminaria japonica* and *Hizikia fusiforme* in skeletal muscle: *in vitro* and *in vivo* model. *Nutrients* 2018; 10: 491.
13. Motshakeri M., Ebrahimi M., Goh Y.M. et al. *Sargassum polycystum* reduces hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress via increasing insulin sensitivity in a rat model of type 2 diabetes. *J Sci Food Agr* 2013; 93 (7): 1772–1778.
14. Motshakeri M., Ebrahimi M., Goh Y.M. et al. Effects of brown seaweed (*Sargassum polycystum*) extracts on kidney, liver and pancreas of type 2 diabetic rat model. Evidence — Based Complementary and Alternative Medicine 2014; Article ID379407:11p.
15. Matanjun P., Mohamed S., Muhammad K., Mustapha N.M. Comparison of cardiovascular protective effects of tropical seaweeds *Kappaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum* on high-cholesterol/high-fat diet in rats. *J. Med Food* 2010; 13: 792–800.
16. Демидова И.Ю., Чазова Т.Е. Использование ингибиторов альфа-глюкозидаз для профилактики сахарного диабета 2 у лиц с нарушенной толерантностью к глюкозе. *Фарматека*. — 2003. — № 3. — С. 5–7. / *Demidova I.Yu., Chazova T.E. Ispol'zovanie ingibitorov al'fa-glyukozidaz dlya profilaktiki sakharного diabeta 2 u lits s narushennoy tolerantnost'yu k glyukoze. Farmateka* 2003; 3: 5–7. [in Russian]
17. Park M.H., Han J.S. Hypoglycemic effect of *Padina arborescens* extract in streptozotocin-induced diabetic mice. *Preventive Nutrition and Food Science* 2012; 17(4): 239–244.
18. Шестакова Е.А., Ильин Ф.В., Шестакова М.В., Дедов И.И. Глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид — новое звено в развитии ожирения. *Ожирение и метаболизм*. — 2015. — № 12 (1). — С. 16–19. / *Shestakova E.A., Il'in F.V., Shestakova M.V., Dedov I.I. Glyukozozavisimyy insulintropnyy polipeptid — novoe zveno v razvitiy ozhireniya. Ozhirenie i metabolizm* 2015; 12 (1): 16–19. [in Russian]
19. Chin Y.X., Lim P.E., Maggs C. A. et al. Anti-diabetic potential of selected Malaysian seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 2015; 27 (50): 2137–2148.
20. Sharafuddin Y., Chin Y.X., Lim P.E., Phang S. Potential Bioactive compounds from seaweed for diabetes management. *Mar. Drugs* 2015; 13 (8): 5447–5491.
21. Akbarzadeh S., Gholampour H., Farzadinia P., Daneshi A., Ramavandi B., Moazzzeni A., Keshavarz M., Bargahi A. Anti-diabetic effects of *Sargassum oligocystum* on streptozotocin-induced diabetic rat. *Indian J. of Basic Med. Sciences* 2018; 21 (3): 342–346.
22. Firdaus M., Soeharto S. *Sargassum polycystum* extract attenuates oxidative stress on diabetic rats. *J. of Coastal Life Medicine* 2016; 4 (12): 944–948.
23. Song W., Wang Z., Zhang X., Li Y. Ethanol extract from *Ulva prolifera* prevents high-fat diet-induced insulin resistance, oxidative stress, and inflammation response in mice. *BioMED Research International* 2018; Article ID1374565, 9 p.
24. Kim K.T., Rioux L.E., Turgeon S. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulates by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 2014; 98: 27–33.
25. Jiang X., Yu J., Ma Z. et al. Effects of fucoidan on insulin stimulation and pancreatic protection via the cAMP signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. *Molec. Med. Reports* 2015; 12 (3): 4501–4507.
26. Anusree M., Chakraborty K. Pharmacological potential of sulfated polygalactopyranosyl — fucopiranan from the brown seaweed *Sargassum wightii*. *J Appl Phycol* 2018; 30 (3): 1971–1988.
27. Lin W., Wang W., Liao D., Chen D., Zhu P., Cai G., Kiyoshi A. Polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* improve glucose metabolism in diabetic rats. *J. Diabetes Res* 2015; 2015: 675201.
28. Tang Z., Gao H., Wang S., Wen S., Qin S. Hypolipidemic and antioxidant properties of a polysaccharide fraction from *Enteromorpha prolifera*. *Int J Biol Macromol* 2013; 58: 186–189.
29. Крыжановский С.П., Гельцер Б.И., Запорожец Т.С., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н. Бурые водоросли Тихого океана в лечении и профилактике атеросклероза. *Владивосток. Дальнаука*. — 2016. — 156 с. / *Kryzhanovskiy S.P., Gel'tser B.I., Zaporozhets T.S., Ermakova S.P., Besednova N.N. Burye vodorosli Tikhogo okeana v lechenii i profilaktike ateroskleroza. Vladivostok. Dal'nauka* 2016; 156. [in Russian]
30. Shan X., Liu X., Hao J., Cai C., Fan F., Dun Y., Zhao X., Liu X., Li C., Yu G. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *Int. J. Biol. Macromol* 2016; 82: 249–255.
31. Kumar T.V., Lakshmanasenthil S., Geetharamani D. et al. Fucoidan — a α -D-glucosidase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to type 2 diabetes mellitus therapy. *Int. J. of Biol Macromol* 2015; 72:1044–1047.
32. Cui W., Zheng Y., Zhang Q. et al. Low-molecular-weight fucoidan protects endothelial function and ameliorates basal hypertension in diabetic gotokakizaki rats. *Lab invest* 2014; 94 (4): 382–393.
33. Yu W. C., Chen Y. L., Hwang P. A., Chen T. H., Chou T. C. Fucoidan ameliorates pancreatic β -cell death and impaired insulin synthesis in streptozotocin-treated β cells and mice via a Sirt-1-dependent manner. *Mol Nutr Food Res* 2017; <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700136>.
34. Suganya A.M., Sanjivcumar M., Chandran N.M., Palavesam A., Immanuel G. Pharmacological importance of sulfated polysaccharide carrageenan from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in comparison with commercial carrageenan. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 1300–1312.
35. Stitt A.W., Curtis T.M., Chen M. et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 2016; 51: 156–186.
36. Wan T.T., Li X.F., Sun Y.M. et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother* 2015; 74: 145–147.
37. Chen M.C., Hsu W.L., Hwang P.A., Chou T.C. Low molecular weight fucoidan inhibits tumor angiogenesis through downregulation of HIF-1/VEGF signaling under hypoxia. *Mar Drugs* 2015; 13 (7): 4436–4451.
38. Narazaki M., Segarra M., Tosato G. Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF165 and semaphoring 3A. *Blood* 2008; 111 (8): 4126–4136.

39. Dithmer M., Fuchs S., Shi Y. et al. Fucoidan reduces secretion and expression of vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium and reduces angiogenesis *in vitro*. PLoS ONE 2014; 6 (2): e89150.
40. Yang W., Yu X., Zhang Q. et al. Attenuation of streptozotacin-induced diabetic retinopathy with low molecular weight fucoidan via inhibition of vascular endothelial growth factor. Exp Eye Res 2013; 115: 96–105.
41. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Ushakova N.A. et al. Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? Glycobiology 2014; 24: 1265–1274.
42. Li X., Zhao H., Wang Q. et al. Fucoidan protects ARPE-19 cells from oxidative stress via normalization of reactive oxygen species generation through the Ca^{2+} — dependent ERK signaling pathway. Mol Med Rep 2015; 11: 3746–3752.
43. Park H.Y., Han M.H., Park C. et al. Anti-inflammatory effect of fucoidan through inhibition of NF- κ B, MAPK and Akt activation in lypopolisaccharide-induced BV2 microglia cells. Food Chem Toxicol 2011; 49 (8): 1745–1752.
44. Teruya T., Takeda S., Tamaki Y., Tako M. Fucoidan isolated from *Laminaria angustata* var. *longissimi* induced macrophage activation. Biosci Biotechnol Biochem 2010; 74 (9): 1960–1962.
45. Yu X., Zhang Q., Cui W. et al. Low molecular weight fucoidan alleviates cardiac dysfunction in diabetic goto-kakizaki rats by reducing oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis. J Diabetes Res 2014. Article ID 420929:13 p.
46. Волкова А.А., Батрак Г.А. Диабетическая нефропатия в структуре микрососудистых осложнений сахарного диабета: сравнительная оценка особенностей течения у лиц с сахарным диабетом 1 и 2 типа. Medicus 2017; 3 (15): 106–107. / Volkova A.A., Batrak G.A. Diabetescheskaya nefropatiya v strukture mikrososudistykh oslozhnenij sakharnogo diabeta: sravnitel'naya otsenka osobennostej techeniya u lits s sakharnym diabetom 1 i 2 tipa. Medicus 2017; 3 (15): 106–107. [in Russian]
47. Wang J., Liu H., Li N. et al. The protective effect of fucoidan in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Mar Drugs 2014; 12 (6): 3292–3306.
48. Xu Y., Zhang Q., Luo D. et al. Low molecular weight fucoidan modulates P-selectin and alleviates diabetic nephropathy. Int. J. Biol. Macromol 2016; 91: 233–240.
49. Kolsi R.B.A., Bkhairia I., Gargouri L., Yotova L., Marinkova D., Radeva G., Fakhfakh J., Krichen F., Feki H., Jarraya R., Hendri M.H. Protective effect of *Sargassum vulgare* sulfated polysaccharide against molecular biochemical and histopathological damage caused by alloxan in experimental diabetic rats. Int J Biol Macromol 2017; 105 (Pt 1): 598–607. doi: 10.1016/j.ijbiomac.
50. Hardoko, Siratantri T., Eveline, Yagabuan M., Olivia S. An *in vitro* study of antidiabetic activity of *Sargassum duplicatum* and *Turbinaria decurrens* seaweed. Int. J. of Pharmaceutical Science Invention 2014; 3 (2): 13–18.
51. Husni A. Therapeutic potential of seaweed polysaccharides for diabetes mellitus. Seaweed biomaterials. Ed. by Sabyasachi Maiti, Intech Open 2018. doi: 10.5772/intechopen.76570.
52. Sani K.F., Samudra A.G., Husni A. *In vitro* α -glucosidase and *in vivo* of antihyperglycemia activity extract of alginate from the brown marine algae *Sargassum hystrix*. J Pharm Res 2017; 11 (8): 927–931.
53. Murray M., Dordevic A.L., Ryan L., Bonham M.P. An emerging trend in functional foods for the prevention of cardiovascular disease and diabetes: marine algal polyphenols. Crit Rev Food Sci Nutr 2018; 58 (8): 1342–1358.
54. Боголицын К.Г., Дружинина А.С., Овчинников Д.В., Каплицын П.А., Шульгина Е.В., Паришина А.Э. Полифенолы бурых водорослей. Химия растительного сырья. — 2018. — № 3. — С. 5–21. / Bogolitsyn K.G., Druzhinina A.S., Ovchinnikov D.V., Kaplitsyn P.A., Shul'gina E.V., Parshina A.E. Polifenoly burykh vodoroslej. Khimiya rastitel'nogo syr'ya 2018; 3: 5–21. [in Russian]
55. Стоник В.А. Биомолекулы. Владивосток. Дальиздат. 2018. 640 с. / Stonik V.A. Biomolekuly. Vladivostok. Dal'izdat, 2018; 640. [in Russian]
56. Machu L., Mizurkova L., Ambrozova J.V., Orsavova J., Mlcek J., Juricova T. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. Molecules 2014; 20 (1): 1118–1133.
57. Connan S., Goulard F., Stiger V., Deslandes E., Ar Gall E. Interspecific and temporal variation in 540 phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. Botanica Marina 2004; 47: 410–416.
58. Gomez-Guzman M., Rodriguez-Nogales A., Algieri F., Galves J. Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular associated disorders. Mar Drugs 2018; 16 (8): 250.
59. Jupudi T., Lavanya R., Reddy C.U.M. *In vitro* antidiabetic and antioxidant activity of bioactive principle from *Sargassum ilicifolium*. Res J Pharm Biol Chem Sci 2018; 9 (4): 1206.
60. Sanjeeva K.K.A., Jeon Y.J. Edible brown seaweeds: a review. J of Food Bioactives 2018; 2: 37–50.
61. Iwai K. Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A(y) mice. Plant Foods Hum Nutr 2008; 63: 163–169.
62. Cha S.H., Hwang Y., Heo S.J., Jun H.S. Diploretohydroxycarmalol attenuates methylglyoxal-induced oxidative stress and advanced glycation and product formation in human kidney cells. Oxid. Med. Cell Longev 2018, Article ID 3654095, 14. https://doi.org/10.1155/2018/3654095.
63. Lee S.H., Park M.H., Park S.J. et al. Bioactive compounds extracted from *Ecklonia cava* by using enzymatic hydrolysis protects high glucose-induced damage in INS-1 pancreatic β -cells. Appl Biochem Biotechnol 2012; 167 (7): 1973–1985.
64. Xu H.L., Kitajima C., Ito H., Miyazaki T., Baba M., Okuyama T., Okada Y. Antidiabetic effect of polyphenols from brown alga *Ecklonia kurume* in genetically diabetic KK-A(y) mice. Pharm Biol 2012; 50 (3): 393–400.
65. Lee S.H., Park M.H., Heo S.J., Kang S.M., Ko S.C., Han J.S. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase *in vitro* and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Food Chem Toxicol 2010; 48: 2633–2639.
66. Panzhinskiy E., Ren J., Nair S. Protein tyrosine phosphatase 1B and insulin resistance: role of endoplasmic reticulum stress/reactive oxygen species/nuclear factor kappa B axis. PLoS ONE 2013; 8: e77228.
67. Park M.H., Han J.S. Phloroglucinol protects ins-1 pancreatic beta-cells against glucotoxicity-induced apoptosis. Phytother Res 2015; 29: 1700–1706.
68. Kim E.A., Lee S.H., Lee J.H., Kang N., Oh J.Y., Ahn G., Ko S.C., Fernando S.P., Kim S.Y., Park S.J., Kim Y.T., Jeon Y.J. A marine algal polyphenol, dieckol, attenuates blood glucose levels by Akt pathway in alloxan induced hyperglycemia zebrafish model. RSC Adv 2016; 6: 78570–78575.
69. Ezzat S.M., El Bishbishi M.H., Habtemariam S., Salehi B., Sharifi-Rad M., Martins N., Sharif-Rad J. Looking at marine-derived bioactive molecules as upcoming anti-diabetic agents: a special emphasis on PTP1B inhibitors. Molecules 2018; 23 (12): 3334.
70. Shi D., Feng X., He J., Li J., Fan X., Han L. Inhibition of bromophenols against PTP1B and anti-hyperglycemic effect of *Rhodomela confervoides* extract in diabetic rats. Chin Sci Bull 2008; 53: 2479.
71. Lee S.H., Jeon Y.J. Efficacy and safety of a dieckol-rich extract (AG-dieckol) of brown algae, *Ecklonia cava* in pre-diabetic individuals: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. Food Funct 2015; 6 (3): 853–858.
72. Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Nifantiev N.E. Synthesis of low-molecular-weight carbohydrate mimics heparin. Bioorg Chem 2011; 37: 745–779.
73. Ermakova S., Kusaykin M., Trincone A., Zvyagintseva T. Are multifunctional marine polysaccharides a myth or reality? Frontiers in Chemistry 2015; 3 (39): 39.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

Ермакова Светлана Павловна — д. х. н., зав. лабораторией химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Макаренкова Илона Дамировна — д. м. н., ведущий науч. сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Крыжановский Сергей Петрович — д. м. н., ученый секретарь МО ДВО РАН, Владивосток

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

Запорожец Татьяна Станиславовна — д. м. н., зам. директора по науке «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Интенсификация этиотропной терапии туберкулёза иммуномодуляторами в условиях патоморфоза заболевания

В. М. КОЛОМИЕЦ¹, А. Л. КОВАЛЕНКО², *Е. В. ТАЛИКОВА³

¹ ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет МЗ РФ, Курск

² ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

³ ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург

Immunomodulators in Maintenance Therapy of Tuberculosis with Its Patomorphosis Features Taken into Consideration

V. M. KOLOMIETS¹, A. L. KOVALENKO², *E. V. TALIKOVA³

¹ Kursk State Medical University, Kursk

² Institute of Toxicology of the Federal Medico-biological Agency, St. Petersburg

³ Saint-Petersburg Medico-Social Institute, St. Petersburg

Одним из основополагающих звеньев патоморфоза туберкулёза в современных условиях является вторичная иммунная недостаточность, которая проявляется на начальном этапе инфекционного процесса, и усугубляется по мере прогрессирования заболевания. В обзоре приведены результаты анализа накопленных клинико-лабораторных данных, подтверждающих высокую эффективность циклоферона как препарата сопровождения при лечении как впервые выявленных форм, так и больных запущенным туберкулёзом, что позволяет рекомендовать его включение в схемы терапии этих форм заболевания. Эффективность применения препарата при лечении коморбидного туберкулёза и в режимах его неспецифической профилактики требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: туберкулёз, патоморфоз, терапия сопровождения, циклоферон.

One of the fundamental features of tuberculosis pathomorphosis in modern conditions is secondary immune deficiency, which manifests itself at the initial stage of the infection process and aggravates as the disease progresses. This review presents analysis results of cumulative clinical and laboratory data, confirming high efficiency of cycloferon as a support drug in the treatment of newly diagnosed tuberculosis forms and in patients with advanced forms, which allows recommending its inclusion in the treatment regimens of these disease forms. The effectiveness of the drug in treatment of comorbid tuberculosis and features of its non-specific prophylaxis require further research.

Keywords: tuberculosis, pathomorphosis, maintenance therapy, cycloferon.

Введение

В России достигнута стабилизация эпидемиологической ситуации по туберкулёзу с наклонностью к её улучшению по основным показателям. Однако сохраняется актуальность интенсификации, прежде всего этиотропной терапии как основного противоэпидемиологического мероприятия [1–4], эффективность которой, несмотря на включение новых препаратов и разработку новых режимов, повышается крайне медленно. Сохраняется напряжённая ситуация с эффективностью лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза, которой в новой стратегии ВОЗ придаётся приоритетное значение [5, 6].

Патоморфоз туберкулёза характеризуется рядом особенностей: изменениями эпидемиологических показателей (рост заболеваемости и

смертности от туберкулёза, ассоциированного с ВИЧ-инфекцией, алкоголизмом и наркоманией), качественными изменениями возбудителя (выявление *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), широкой (ШЛУ) и сверхустойчивостью) и особенностями клинических форм заболевания (увеличение доли прогрессирующих форм — казеозной пневмонии, генерализованного и диссеминированного туберкулёза, внелёгочных форм — туберкулёзного менингоэнцефалита, поражения кишечника, прогрессирующего первичного туберкулёза у детей) [7–9]. Всё это диктует необходимость изменений в терапевтических подходах: расширения спектра и включения в схемы новых препаратов этиотропной терапии — одновременным назначением от 4 до 9 препаратов с длительностью курсов 6–24 мес. При этом противотуберкулёзные препараты не обладают абсолютной избирательностью действия и могут влиять на разные органы и системы организма, вызывая неже-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 195271, Санкт-Петербург, Кондратьевский пр., д. 72, литера. А. ЧОУ ВО СПбМСИ

лательные побочные эффекты и неблагоприятные побочные реакции [10, 11].

При этом врождённый иммунодефицит у пациентов с туберкулёзной инфекцией встречается крайне редко, но часто (до 80–90%) обнаруживается вторичная иммунная недостаточность, которая в начале заболевания является одним из пусковых факторов её развития и углубляется в процессе инфекционного поражения организма пациента [12–14]. Выявлено, что при распространённых формах туберкулёза имеет место нарушение баланса цитокинов, а у пациентов с активным туберкулёзом снижается интерферонпродуцирующая способность клеток [15]. Установлено, что у большинства больных присутствуют дефекты антигенспецифического Т-клеточного ответа, проявляющегося в угнетении пролиферации периферических Т-лимфоцитов, продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) и γ -интерферонов (ИФН- γ) [16].

В связи с этим, в терапии сопровождения, направленной на повышение эффективности этиотропного лечения, всё большее значение приобретают препараты с иммунокорректирующим действием — индукторы интерферонов, которые представляют собой различные высоко- и низкомолекулярные природные и синтетические соединения, активирующие собственную систему интерфероногенеза. В частности, для коррекции иммунодефицитов, связанных с продукцией ИФН- γ , что характерно для туберкулёзного процесса, хорошо зарекомендовал себя меглюмина акридоната (Циклоферон, ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург) — низкомолекулярный индуктор интерферонов, оказывающий стимулирующее воздействие на фагоцитарную активность макрофагов, усиливающий специфическое цитотоксическое действие лимфоцитов и стимулирующее образование антител и лимфокинов, активирующий Т-лимфоциты и естественные киллеровские клетки, нормализующий баланс между субпопуляциями Т-хелперов и Т-супрессоров. [14, 17–21]. Отмечено, что препарат, воздействуя на киллеровские клетки и гепатоциты, повышает и устойчивость к повреждающему действию противотуберкулёзных препаратов [22]. В последние годы опубликованы работы по исследованию механизмов индукции интерферона, которые реализуются через взаимодействие молекул меглюмина акридоната с белком-стимулятором интерфероногенеза (STING), способствуя фосфорилированию интерферон-регуляторного фактора-3 (IRF3) с последующей стимуляцией транскрипции генов интерферона [23, 24].

Накоплен материал по опыту включения циклоферона в схемы терапии пациентов с разными формами туберкулёза лёгких. Результаты исследований были проанализированы с помощью метаанализа обобщённых данных. Было показано, что использование препарата более чем в 2,7 раза

повышает шансы быстрого выздоровления и снижает вероятность развития неблагоприятных явлений этиотропной терапии [25]. При этом следует отметить, что в преобладающем большинстве случаев циклоферон использовали для лечения впервые выявленных больных с инфильтративным туберкулёзом лёгких [22, 26–28].

В настоящем обзоре представлен анализ данных об эффективности включения циклоферона в схемы лечения туберкулёза, опубликованные в 30 рекомендованных ВАК журналах и 8 изданиях стран СНГ (в целом же материалы представлены более чем в 80 различных публикациях стран СНГ). Было выявлено, что включение препарата в схемы терапии пациентов с впервые выявленными распространёнными формами туберкулёза лёгких повышает уровень ИФН- γ в 3,8 раза через 3 мес. лечения [15]. Это проявляется в том числе положительной динамикой клинико-лабораторных показателей: более ранним купированием клинической симптоматики, укорочением сроков абациллирования, сокращением времени закрытия полостей распада, положительной рентгенологической динамикой и уменьшением выраженности побочных эффектов от этиотропной терапии (снижение частоты повышенных ферментных маркёров синдрома цитолиза) [15, 21, 28].

Установлено, что включение циклоферона как препарата сопровождения этиотропной терапии запущенных форм туберкулёза (с хроническим течением и, как правило, лекарственной устойчивостью) повышает приверженность больных лечению, что в свою очередь повышает эффективность лечения [29]. Кроме того, показана эффективность применения препарата в комбинации с другими реабилитационно-восстановительными мероприятиями и витаминами в терапии сопровождения [30, 31]. При этом учитывалось не только повышение частоты клинического излечения, но и другие показатели: включение циклоферона в терапию сопровождения увеличивало процент успешного результата лечения на 25,5% при лекарственно-чувствительном и на 36,7% — при лекарственно-устойчивом туберкулёзе, а также сопровождалось снижением на 16,5% расходов на содержание одного пациента, то есть являлось экономически эффективным [8, 32].

Как уже упоминалось выше, при решении вопроса о целесообразности включения в схемы терапии сопровождения препаратов с иммуномодулирующим действием необходимо учитывать, что схемы базовой противотуберкулёзной терапии являются многокомпонентными и длительными, и в настоящее время после её завершения клиническое излечение констатируют только у 46% и то лишь у впервые выявленных больных [1]. В числе главных причин столь низкой эффективности называют нарастающую устойчивость возбудителя к

этиотропным препаратам, низкую приверженность (комплаентность) больных лечению и плохую переносимость терапии вследствие высокой частоты нежелательных побочных реакций [11].

Включение циклоферона в схемы лечения пациентов с инфильтративными формами туберкулёза, сочетанными с гепатитами различной этиологии (вирусные, токсические), показало выраженный положительный эффект: ускорение элиминации возбудителя, что опосредовало уменьшение симптомов интоксикации, ускорение темпов закрытия полостей распада и снижение бактериовыделения; нормализация функции печени (снижение биохимических маркёров цитолиза) и коррекция цитокинового статуса в сторону позитивного Th1-ответа [18].

В связи с этим целесообразно использовать иммунокоррекцию в лечении ВИЧ-ассоциированного туберкулёза. Особенный интерес вызывают, к сожалению, единичные, данные о применении циклоферона у этих больных: отмечена наиболее выраженная положительная динамика (уменьшение выраженности и сроков специфической туберкулёзной интоксикации и проявлений респираторного синдрома) у ВИЧ-инфицированных пациентов с иммунным резервом. Препарат хорошо переносился больными, совместим с основными лекарственными средствами что позволяет рекомендовать его для включения в комплексную терапию СПИД-ассоциированных инфекций [32–35].

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И. А., Белиловский Е. М., Борисов С. Е., Стерликов С. А. Заболеваемость, смертность и распространённость — показатели бремени туберкулёза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и распространённость туберкулёза Туберкулёз и болезни лёгких. — 2017. — Т. 95. — № 6. — С. 9–21. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-9-21 / Vasil'eva I. A., Belilovskij E. M., Borisov S. E., Sterlikov S. A. Zaboлеваemost', smertnost' i rasprostranennost' — pokazateli bremeni tuberkuleza v regionakh VOZ, stranakh mira i v Rossijskoj Federatsii. Chast' 1. Zaboлеваemost' i rasprostranennost' tuberkuleza Tuberkuлез i Bolezni Legkikh 2017; 95 (6): 9–21. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-9-21. [in Russian]
2. Нечаева О. Б. Эпидемическая ситуация по туберкулёзу в России Туберкулёз и болезни лёгких. — 2018. — Т. 96. — № 8. — С. 15–24. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24. / Nechaeva O. B. Epidemicheskaya situatsiya po tuberkulezu v Rossii Tuberkuлез i Bolezni Legkikh 2018; 96 (8): 15–24. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24. [in Russian]
3. Равильоне М., Коробицин А. А. Ликвидация туберкулёза — новая стратегия ВОЗ в эру устойчивого развития, вклад Российской Федерации. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2016. — Т. 94. — № 11. — С. 7–15. DOI: 10.21292/2075-1230-2016-94-11-7-15. / Ravil'one M., Korobitsin A. A. Likvidatsiya tuberkuleza — novaya strategiya VOZ v eru ustojchivogo razvitiya, vklad Rossijskoj Federatsii. Tuberkuлез i Bolezni Legkikh 2016; 94 (11): 7–15. DOI: 10.21292/2075-1230-2016-94-11-7-15. [in Russian]
4. Васильева И. А., Эрговашов А. Э., Самойлова А. Г., Киселева Ю. Ю., Иванов А. К., Яблонский П. К. Отдалённые результаты применения стандартных режимов химиотерапии у больных туберкулёзом органов дыхания. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2012. — № 4. — С. 3–8. / Vasil'eva I. A., Ergashov A. E., Samojlova A. G., Kiseleva Yu. Yu., Ivanov A. K., Yablonskij P. K. Otdalennyye rezul'taty primeneniya standartnykh rezhimov khimioterapii u bol'nykh tuberkulezom organov dykhaniya. Tuberkuлез i Bolezni Legkikh 2012; 4: 3–8. [in Russian]
5. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva, World Health Organization (WHO) Library Cataloguing-in-Publication Data. (WHO/HTM/TB/013.11).
6. WHO handbook for guideline development. Geneva: World Health Organization, 2012; 63.
7. Бердников Р. Б., Кондрашов Д. Л., Гринберг Л. М. Патоморфоз туберкулёза и алгоритмы построения патологоанатомического диагноза. Медицинский альянс. — 2013. — № 4. — С. 11–17. / Berdnikov R. B., Kondrashov D. L., Grinberg L. M. Patomorfоз tuberkuleza i algoritmy postroeniya patologoanatomicheskogo diagnoza. Meditsinskij Alyans 2013; № 4: 11–17. [in Russian]
8. Гринберг Л. М. Актуальные проблемы патологии микобактериальных инфекций. Эл. журнал: <http://ftiziolpulmo.ru/fp/i/full/aktualnyeproblemyapatolo.pdf>, послед. обращение 9.10.2019. / Grinberg L. M. Aktual'nye problemy patologii mikobakterial'nykh infektsij. El. zhurnal: <http://ftiziolpulmo.ru/fp/i/full/aktualnyeproblemyapatolo.pdf>, posled. obrashchenie 9.10.2019. [in Russian]
9. Ерохин В. Р., Гедымин Л. Е., Земскова З. С., Лепеха Л. Н., Пархоменко Ю. Г., Зюзя Ю. Р., Бурцева С. А., Дюканова М. Я., Флигель Д. М. Патолого-анатомическая диагностика основных форм туберкулёза (по данным секционных исследований). Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. — 2008. — № 7. — С. 54–64. / Erokhin V. R., Gedymin L. E., Zemskova Z. S., Lepkha L. N., Parkhomenko Yu. G., Zyzuya Yu. R., Burtseva S. A., Dzyukanova M. Ya., Fligel' D. M. Patologo-anatomicheskaya diagnostika osnovnykh form tuberkuleza (po dannym sektiionnykh issledovaniy). Problemy Tuberkuлеza i Boleznej Legkikh 2008; 7: 54–64. [in Russian]
10. Волф С. Б. Нежелательные побочные реакции на химиотерапию туберкулёза. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2016. — № 3. — С. 140–146. / Vol'f S. B. Nezhelatel'nye pobochnye reaktsii na khimioterapiyu tuberkuleza. Zhurnal Grodnenskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta 2016; № 3: 140–146. [in Russian]
11. Иванова Д. А., Борисов С. Е. Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулёзом. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2017. — Т. 95. — № 6. — С. 22–29. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-22-29. / Ivanova D. A., Borisov S. E. Spekt'r i faktory riska nezhelatel'nykh pobochnykh reaktsij pri lechenii v pervyye vyavlennykh bol'nykh tuberkulezom. Tuberkuлез i Bolezni Legkikh 2017; 95 (6): 22–29. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-22-29. [in Russian]
12. Мордык А. В., Цыганкова Е. А., Пузырева Л. В., Турица А. А. Противотуберкулёзный иммунитет и механизмы его формирования (обзор литературы). Дальневосточный медицинский журнал. — 2014. — № 1. — С. 126–130. / Mor'dyk A. V., Tsygankova E. A., Puzyreva L. V., Turitsa A. A. Protivotuberkuleznyy immunitet i mekhanizmy ego formirovaniya (obzor literatury) Dal'nevostochnyy Meditsinskij Zhurnal 2014; 1: 126–130. [in Russian]
13. Чурина Е. Г., Уразова О. И., Новицкий В. В., Есимова И. Е., Кононова Т. Е., Филинок О. В., Колобовникова Ю. В., Дмитриева А. И. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулёзе лёгких. Бюллетень сибирской медицины. — 2016. — № 15 (5). — С. 166–177. DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-166-177 / Churina E. G., Urazova O. I., Novitskiy V. V., Esimova I. E., Kononova

Перспективным представляется возможность использования иммуномодуляторов (индукторов интерферона) для профилактики туберкулёза, особенно в экстренных случаях в группах риска (например — в пенитенциарных учреждениях). К сожалению, эти вопросы практически не рассматривались, хотя накоплен большой материал по успешному опыту применения циклоферона не только при лечении, но и профилактике других инфекционных заболеваний [18, 29].

Выводы

Одним из основополагающих звеньев патоморфоза туберкулёза в современных условиях является вторичная иммунная недостаточность, которая проявляется на начальном этапе инфекционного процесса, и усугубляется по мере прогрессирования заболевания.

На основании накопленных клинико-лабораторных данных подтверждена высокая эффективность циклоферона как препарата сопровождения при лечении как впервые выявленных форм, так и больных запущенным туберкулёзом, что является основанием рекомендовать его включение в схемы терапии этих форм заболевания.

Эффективность применения препарата при лечении ВИЧ-ассоциированного туберкулёза и в режимах его неспецифической профилактики требует дальнейших исследований.

- T.E., Filin'yuk O.V., Kolobovnikova Jyu.V., Dmitrieva A.I.* Faktory disregulyatsii immunnogo otveta (na razlichnykh etapakh ego realizatsii) pri tuberkuleze legkikh. *Bjulleten' Sibirskoy Meditsiny* 2016; 15 (5): 166–177. DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-166-177 [in Russian]
14. *Филиппова Т.П., Васильева Л.С., Кочкин А.В.* Применение циклоферона в лечении больных туберкулезом лёгких со слабо выраженными клиническими проявлениями. *Терапевтический архив*. — 2010. — № 11. — С. 49–53. / *Filippova T.P., Vasil'eva L.S., Kochkin A.V.* Primenenie tsikloferona v lechenii bol'nykh tuberkulezom legkikh so slabo vyrazhennymi klinicheskimi proyavleniyami. *Terapevticheskij Arkhiv* 2010; 11: 49–53. [in Russian]
 15. *Правада Н.С., Будрицкий А.М.* Комплексная терапия с применением иммунотропных препаратов при туберкулезе и система интерферона-гамма. *Вестник ВГМУ*. — 2015. — Т. 14. — № 4. — С. 5–14. / *Pravada N.S., Budritskiy A.M.* Kompleksnaya terapiya s primeneniem immunotropnykh preparatov pri tuberkuleze i sistema interferona-gamma. *Vestnik VGMU* 2015; 14 (4): 5–14. [in Russian]
 16. *Мезенцева М.В., Стаханов В.А., Захарова М.В., Зотова И.Ф., Шаповал И.М., Трегубова М.И., Руссу Л.И.* Перспективы иммунотерапии в комплексном лечении инфильтративного туберкулеза лёгких. Биопрепараты. — 2011. — № 2. — С. 20–25. / *Mezentseva M.V., Stakhanov V.A., Zakharova M.V., Zotova I.F., Shapoval I.M., Tregubova M.I., Russu L.I.* Perspektivy immunoterapii v kompleksnom lechenii infiltrativnogo tuberkuleza legkikh. *Biopreparaty* 2011; 2: 20–25. [in Russian]
 17. *Баласанянц Г.С., Суханов Д.С.* Некоторые аспекты патогенетической терапии при туберкулезе в современных условиях. *Терапевтический архив*. — 2011. — № 8. — С. 21–24. / *Balasanyants G.S., Sukhanov D.S.* Nekotorye aspekty patogeneticheskoy terapii pri tuberkuleze v sovremennykh usloviyakh. *Terapevticheskij Arkhiv* 2011; 8: 21–24. [in Russian]
 18. *Исаков Д.В., Исаков В.А.* Циклоферон: механизмы действия и новые перспективы применения в клинической практике. *Клиническая медицина*. — 2015. — Т. 93. — № 9. — С. 46–51. / *Isakov D.V., Isakov V.A.* Tsikloferon: mekhanizmy dejstviya i novye perspektivy primeneniya v klinicheskoy praktike. *Klinicheskaya Meditsina* 2015; 93 (9): 46–51. [in Russian]
 19. *Лазаренко Л.Л.* Влияние циклоферона на цитокиновый статус больных гепатитами, сочетанными с инфильтративной формой туберкулеза лёгких. Медицинский алфавит. Лаборатория. — 2009. — № 1. — С. 32–37. / *Lazarenko L.L.* Vliyaniye tsikloferona na tsitokinovyy status bol'nykh gepatitami, sochetannymi s infiltrativnoy formoy tuberkuleza legkikh. *Meditsinskij Alfavit. Laboratoriya* 2009; 1: 32–37. [in Russian]
 20. *Правада Н.С., Будрицкий А.М., Суханов Д.С.* Комплексная терапия пациентов с распространенными формами туберкулеза лёгких с применением меглюмина акридонацетата. Антибиотики и химиотер. — 2014. — № 5–6. — С. 3–7. / *Pravada N.S., Budritskiy A.M., Sukhanov D.S.* Kompleksnaya terapiya patsientov s rasprostranennymi formami tuberkuleza legkikh s primeneniem meglumina akridonatsetata. *Antibiotiki i Khimioter* 2014; 5–6: 3–7. [in Russian]
 21. *Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Демидик С.Н., Заболотных Н.В., Васильева С.Н., Коваленко А.Л., Витовская М.Л.* Иммунотропная и антигипоксантная терапия экспериментального лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2013. — № 1. — С. 65–69. / *Sukhanov D.S., Vinogradova T.I., Demidik S.N., Zabolotnykh N.V., Vasil'eva S.N., Kovalenko A.L., Vitovskaya M.L.* Immunotropnaya i antigipoksantnaya terapiya eksperimental'nogo lekarstvenno-chuvstvitel'nogo i lekarstvenno-ustoychivogo tuberkuleza. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya* 2013; 1: 65–69. [in Russian]
 22. *Демидик С.Н., Вольф С.Б.* Иммунокоррекция в комплексном лечении туберкулеза лёгких. Гродно: ГрГМУ. 2016. — 144 с. / *Demidik S.N., Volf S.B.* Immunokorreksiya v kompleksnom lechenii tuberkuleza legkikh. *Grodno: GrGMU*, 2016; 144 s. [in Russian]
 23. *Cavlar T., Deimling T., Ablasser A., Hopfner K.P., Hornung V.* Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *EMBO J.* 2013 May 15; 32 (10): 1440–1450. doi: 10.1038/emboj.2013.86. Epub 2013 Apr 19.
 24. *Tanaka Y., Chen Z.J.* STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal.* 2012 Mar 6; 5 (214): ra20. doi: 10.1126/scisignal.2002521.
 25. *Мазина Н.К., Мазин В.П., Хафизьянова Р.Х.* Клиническая эффективность циклоферона в составе комплексной терапии туберкулеза. Систематический обзор и результаты метаанализа. Антибиотики и химиотер. — 2019. — № 3–4. — С. 8–16. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100013 / *Mazina N.K., Mazin V.P., Khafiz'yanova R.Kh.* Klinicheskaya effektivnost' tsikloferona v sostave kompleksnoy terapii tuberkuleza. *Sistematicheskij obzor i rezul'taty metaanaliza Antibiotiki i Khimioter* 2019; № 3/4: 8–16. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100013 [in Russian]
 26. *Богущ Н.В., Даныкевич Е.Н., Козлов И.Г., Стаханов В.А.* Иммуномодуляторы в комплексном лечении туберкулеза органов дыхания с множественной лекарственной устойчивостью. *M.tuberculosis*. Туберкулез и болезни лёгких. — 2015. — № 6. — С. 31–32. / *Bogush N.V., Dan'kevich E.N., Kozlov I.G., Stakhanov V.A.* Immunomodulyatory v kompleksnom lechenii tuberkuleza organov dykhaniya s mnozhestvennoy lekarstvennoy ustojchivost'yu. *M.tuberculosis* Tuberkulez i Bolezni Legkikh 2015; 6: 31–32. [in Russian]
 27. *Гельберг И.С., Вольф С.Б., Демидик С.Н., Авласенко В.С., Алекс Е.Н., Шевчук Д.В., Суханов Д.С., Коваленко А.Л.* Применение циклоферона в комплексном лечении больных туберкулезом лёгких. Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии. — 2009. — № 1. — С. 176–182. / *Gel'berg I.S., Volf S.B., Demidik S.N., Avlasenko V.S., Alekso E.N., Shevchuk D.V., Sukhanov D.S., Kovalenko A.L.* Primenenie tsikloferona v kompleksnom lechenii bol'nykh tuberkulezom legkikh. *Vestnik Sankt-Peterburgskoj Gosudarstvennoj Meditsinskoy Akademii* 2009; 1: 176–182. [in Russian]
 28. *Суханов Д.С.* Иммунотропная терапия туберкулезной инфекции. *Терапевтический архив*. 2013. — № 3. — С. 110–117. / *Sukhanov D.S.* Immunotropnaya terapiya tuberkuleznoj infektsii. *Terapevticheskij arkhiv*. 2013; 3: 110–117. [in Russian]
 29. *Коломиец В.М., Рублева Н.В., Вольф С.Б., Демидик С.Н.* Эффективность применения иммуномодуляторов в лечении деструктивных форм туберкулеза лёгких. Курский научн.-практич. вестн. «Человек и его здоровье». — 2013. — № 1. — С. 81–85. / *Kolomiets V.M., Rubleva N.V., Volf S.B., Demidik S.N.* Effektivnost' primeneniya immunomodulyatorov v lechenii destruktivnykh form tuberkuleza legkikh. *Kurskiy Nauchn.-Praktich. Vestn. «Chelovek i ego Zdorov'e»* 2013; 1: 81–85.
 30. *Коломиец В.М., Рачина Н.В., Вольф С.Б., Демидик С.Н., Маслеников А.А.* Эффективность патогенетической терапии при туберкулезе лёгких с использованием иммуномодуляторов. Туберкулез и болезни лёгких. — 2013. — № 8. — С. 45–49. / *Kolomiets V.M., Rachina N.V., Volf S.B., Demidik S.N., Maslennikov A.A.* Effektivnost' patogeneticheskoy terapii pri tuberkuleze legkikh s ispol'zovaniem immunomodulyatorov. *Tuberkulez i Bolezni Legkikh* 2013; 8: 45–49. [in Russian]
 31. *Рублева Н.В., Коломиец В.М., Кочёткова Е.А.* Лечебно-реабилитационные мероприятия у больных туберкулезом лёгких с разной приверженностью к лечению. Антибиотики и химиотер. — 2016. — Т. 61. — № 1–2. — С. 9–14. / *Rubleva N.V., Kolomiets V.M., Kochetkova E.A.* Lechebno-reabilitatsionnye meropriyatiya u bol'nykh tuberkulezom legkikh s raznoy priverzhennost'yu k lecheniyu. *Antibiotiki i Khimioter* 2016; 61 (1–2): 9–14. [in Russian]
 32. *Сологуб Т.В., Иванов А.К., Пантелеев А.М., Йола И., Зайцева А.В.* Использование циклоферона и интерферона человеческого гамма-препарата ингавирон в комплексном лечении больных туберкулезом лёгких и ВИЧ-инфекцией. Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии. — 2006. — № 3. — С. 150–154. / *Sologub T.V., Ivanov A.K., Panteleev A.M., Jola I., Zajtseva A.V.* Ispol'zovanie tsikloferona i interferona chelovecheskogo gamma-preparata ingaron v kompleksnom lechenii bol'nykh tuberkulezom legkikh i VICH-infektsiej. *Vestnik Sankt-Peterburgskoj Gosudarstvennoj Meditsinskoy Akademii* 2006; 3: 150–154. [in Russian]
 33. *Иванов А.К., Пантелеев А.М., Суханов Д.С., Сологуб Т.В., Романцов М.Г.* Применение циклоферона в комплексном лечении больных туберкулезом, инфицированных ВИЧ и вирусными гепатитами. Клиническая медицина. — 2010. — № 5. — С. 49–51. / *Ivanov A.K., Panteleev A.M., Sukhanov D.S., Sologub T.V., Romantsov M.G.* Primenenie tsikloferona v kompleksnom lechenii bol'nykh tuberkulezom, infitsirovannykh VICH i virusnymi gepatitami. *Klinicheskaya Meditsina* 2010; 5: 49–51. [in Russian]
 34. *Леонова О.Н., Фоменко Н.В., Коваленко А.Л., Исаков В.А., Кокишаров Е.Л.* Терапия циклофероном СПИД-ассоциированных заболеваний. Социально значимые болезни и состояния. — 2006. — Т. 7. — № 4. — С. 147–152. / *Leonova O.N., Fomenko N.V., Kovalenko A.L., Isakov V.A., Koksharov E.L.* Terapiya tsikloferonom SPID-assotsirovannykh zabolevaniy. *Sotsial'no Znachimye Bolezni i Sostoyaniya* 2006; 7 (4): 147–152. [in Russian]
 35. *Еришов Ф.И., Шульдяков А.А., Романцов М.Г., Ляпина Е.П., Соболева Л.А.* Результаты и перспективы использования индукторов интерферона в лечении инфекционных болезней. Вестник РАМН. — 2013. — № 10. — С. 46–52. / *Ershov F.I., Shul'dyakov A.A., Romantsov M.G., Lyapina E.P., Soboleva L.A.* Rezul'taty i perspektivy ispol'zovaniya induktorov interferona v lechenii infektsionnykh boleznej. *Vestnik RAMN* 2013; 10: 46–52. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Коломиец Владислав Михайлович — д. м. н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск

Коваленко Алексей Леонидович — д. б. н., к. х. н., дважды лауреат Государственной премии в области науки и техники, ведущий научный сотрудник, Федеральное госу-

дарственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» Санкт-Петербург

Таликова Екатерина Владимировна — к. м. н., доцент кафедры морфологии, патологии и судебной медицины, Частное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт» (ЧОУ ВО СПбМСИ), Санкт-Петербург

Пути реализации неантибактериальных эффектов антибиотиков, широко применяемых в клинической практике

*Е. С. БАЕВА, В. Г. АРТЮХОВ

Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко, Воронеж

Ways to Implement Non-Antibacterial Effects of Antibiotics Widely Used in Clinical Practice

*E. S. BAEVA, V. G. ARTYUKHOV

Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko, Voronezh

В статье приводится обзор литературы о механизмах поступления и действия антибиотиков различных классов на клеточные системы организма человека. Рассмотрены неантибактериальные эффекты широко используемых в клинической практике антимикробных препаратов. Приведены результаты собственных исследований биофизических механизмов взаимодействия антибиотиков с клетками эукариот на примере модельной системы «антибиотик–эритроцит». Используя биофизические методы (регистрации осмотических и кислотных эритрограмм, сканирующей электронной микроскопии, абсорбционной спектрофотометрии, протолитометрического титрования), выявлено определённое сродство антибиотиков к эритроцитарным клеткам человека. Показано, что изученные антибиотики, проникая в клетки, индуцируют гетерогенные изменения эритроцитарных популяций, воздействуя на их полиморфизм и количество двояковогнутых дискоцитов. Выявлен дозозависимый эффект структурных модификаций клеток, определяемый временем взаимодействия с антибиотиками и их химическим строением. Антибиотики индуцируют изменение структурно-функциональных свойств внутриэритроцитарного гемоглобина, что отражается, в том числе, в снижении концентрации метформы гемопротеида. Представленный обзор результатов собственных исследований, а также данные литературы позволяют рассматривать антибиотики в качестве модифицирующих агентов, обуславливающих типовую реакцию эритрона периферического звена на патогенетическое воздействие.

Ключевые слова: антибиотики, эритроциты, поверхностная архитектура, абсорбционная спектрофотометрия.

The article provides a review of the literature on the mechanisms of entry and action of antibiotics of various classes on the cellular systems of the human body. The non-antibacterial effects of antimicrobials widely used in clinical practice are considered. The results of authors' own studies of the biophysical mechanisms of antibiotics interaction with eukaryotic cells are presented on the example of the «antibiotic-erythrocyte» model system. A certain affinity of antibiotics for human erythrocyte cells was revealed using biophysical methods (recording osmotic and acid erythrograms, scanning electron microscopy, absorption spectrophotometry, protolithometric titration). It was shown that when the studied antibiotics penetrate into the cells, they induce heterogeneous changes in erythrocyte populations, affecting their polymorphism and the number of biconcave discocytes. A dose-dependent effect of structural modifications of cells, determined by the time of interaction with antibiotics and their chemical structure, was revealed. Antibiotics induce a change in the structural and functional properties of intraerythrocyte hemoglobin, which is reflected, inter alia, in a decrease in the concentration of the hemoprotein met-forms. The presented review of the results of authors' own studies, as well as the literature data, allows authors to consider antibiotics as modifying agents, causing a typical reaction of the erythron of the peripheral unit to the pathogenetic effect.

Keywords: antibiotics, red blood cells, surface architectonics, absorption spectrophotometry.

Введение

Одним из важнейших достижений современной медицины является успешное использование антимикробных препаратов в терапии потенциально опасных для жизни инфекций, что стало возможным благодаря быстрому антимикробному воздействию, патогенетической и иммуногенной коррекции для ликвидации очага и последствий его агрессии [1]. Однако широкое распространение и не всегда рациональное применение ан-

тибиотиков в развитых и развивающихся странах мира привели к нежелательным последствиям — появлению побочных эффектов различного рода, зачастую обусловленных наличием у многих антибиотиков так называемых неантибактериальных эффектов [2–6]. Показано, что многие антимикробные препараты способны воздействовать на различные физиологические системы человека: влиять на фагоцитарную активность макрофагов, агрегационные свойства тромбоцитов, структурно-функциональные свойства эритроцитов, секрецию слизи бокаловидными клетками бронхов и др. [4, 7–14]. Зачастую величина эффекта антибактериального препарата находится в прямой зависимости от его концентрацией в месте

© Е. С. Баева, В. Г. Артюхов, 2019

*Адрес для корреспонденции: 394018 г. Воронеж, Университетская пл., 1. Воронежский ГМУ им. Н. Н. Бурденко

действия: оптимально подобранная концентрация антибиотика позволяет максимально снизить вероятность появления побочных эффектов [15]. Более того, исследование действия субингибиторных концентраций некоторых антибиотиков (к примеру, тетрациклинов) указывает на возможность получения противовоспалительного эффекта без антимикробного [16, 17]. Учитывая важность структурной целостности клеток, остаются дискуссионными вопросы молекулярно-клеточных механизмов взаимодействия антибиотиков с физиологическими системами организма, знание которых позволит более точно оценить степень их влияния с целью прогнозирования и минимизации нежелательных реакций. На основании вышесказанного, рассмотрим основные способы проникновения антибиотиков в клетки про- и эукариот, а также известные механизмы их действия на клетки макроорганизма.

Поступление антибиотиков в клетки про- и эукариот

Открытие антимикробных средств послужило новой вехой в терапии воспалительных заболеваний. С современной точки зрения антибиотики — конечные продукты обмена веществ организмов, накапливающиеся внутри клетки или выделяющиеся в окружающую среду, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определённым группам микроорганизмов или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост либо полностью подавляющие их развитие [18]. Между противомикробными препаратами есть определённые сходства, которые ещё больше усиливаются внутри каждого класса и химической группы [3, 19].

Клиническая эффективность антибиотиков определяется их распределением в органах и тканях, степенью связывания белками и способностью проникать через физиологические барьеры организма [20–22]. В зависимости от физико-химических свойств, типов преграждающих биологических барьеров, вещества, попадающие в кровь, распространяются весьма неравномерно [23]. Избирательность действия антибиотиков объясняется различиями в структуре ферментов, катализирующих одни и те же реакции у разных типов организмов. Антибиотик будет активным только в том случае, если его концентрация в клетке достаточна для подавления её роста. Внутриклеточная концентрация антибиотика является результирующей его скорости поступления из среды внутрь клетки и скорости, с которой он разбавляется в результате деления клеток [24]. Фактор избирательности распределения играет важную роль для активности лекарственных средств. Например, тетрациклины преимущественно накапливаются в клетках бактерий, но не млекопитающих.

Большинство антибиотиков поступает в клетку эукариот путём диффузии со скоростью, пропорциональной градиентам концентрации между наружной и внутренней средой клетки и зависящей от физико-химической природы барьера [24]. Диффузия может происходить только в том случае, если антибиотик имеет «подходящую» степень липофильности. Антибиотики, обладающие бактериостатическим действием, связываются с субклеточными структурами, на которые они действуют, с меньшим сродством [24]. Активный транспорт лекарственного вещества из крови происходит только в печени и почках, которые его выводят. Простая диффузия гидрофильных веществ через мембрану эндотелиальных клеток затруднена. Однако при выраженном воспалении такие препараты могут проникать в спинномозговую жидкость.

В крови слабые основания (макролиды, фторхинолоны, клиндамицин) находятся в неионизированной форме. Из-за более низкого, по сравнению с кровью, pH внутриклеточной жидкости эти вещества ионизируются, что затрудняет их проникновение обратно во внеклеточную жидкость. Связывание препарата с белками снижает его активность в крови. Эффект «ионной ловушки» определяется рКа лекарственного вещества и разностью между pH крови и тканей. К примеру, большинство бета-лактамов антибиотиков — слабые кислоты, поэтому они легче покидают клетку [24]. Фторхинолоны создают высокие концентрации в крови и тканях организма благодаря высокой липофильности, большим значениям рКа и низкому связыванию с белками плазмы. В фагоциты они проникают по механизму пассивной диффузии. На скорость поступления препарата в клетку влияют наличие и природа заместителей в положении 7 и 8 молекулы. Существует мнение, что несколько специфических мембранных переносчиков аминокислот, нуклеотидов и дипептидов играют роль в транспорте офлоксацина, однако другие авторы не подтверждают эти данные [25].

Тетрациклины внедряются в микроорганизмы путём пассивной диффузии или частично через гидрофильные каналы активным транспортом. Жирорастворимые антибиотики (хлорамфеникол, триметоприм и др.) легко проникают через фагоцитарные мембраны. Антибиотики пенициллинового ряда способны проникать в фагоциты преимущественно по механизму пассивной диффузии [5].

Водорастворимые антибиотики проникают в клетку при участии энергозависимого активного механизма, использующего специфические переносчики (аминогликозиды) [22]. В фагоцитах аминогликозиды аккумулируются медленно посредством пиноцитоза. Гликопротеин 330 (Ca^{2+} -зависимый протеин, мегалин) опосредует захват различных многоосновных антибиотиков, таких как полимиксин В и аминогликозиды, эпителиальными клетка-

ми, а также Ca^{2+} -зависимый захват полимиксина В макрофагами и макролидов нейтрофилами [26, 27]. Некоторые авторы предполагают наличие нуклеозидной транспортной системы для захвата джозамицина и рокситромицина клетками [5].

Действие антибиотиков на клетки эукариот

Начальной стадией в патогенезе инфекционного процесса является адгезия патогена к клеткам макроорганизма. Антибиотик, в зависимости от концентрации, способствует адгезии микробов на эпителиальных клетках слизистой или подавляет её. Некоторые антибиотики взаимодействуют со стеринами клеточных мембран эукариот, вызывая их необратимое повреждение.

Все антибиотики, действующие на клеточную мембрану, могут вызывать нарушения осмотических свойств клетки [19]. Выявлено, что антибиотики пенициллинового ряда уменьшают гидрофобные взаимодействия между белками и липидами эритроцитарных мембран [10]. Полиеновый антибиотик макролид амфотерицин В образует в мембранах селективные поры с радиусом 0,4 нм, которые проницаемы для воды, ионов двухвалентных металлов, некоторых анионов и небольших нейтральных молекул [28].

Полиеновый антибиотик филиппин в определённых концентрациях формирует ионные каналы в клеточных мембранах, увеличивая проводимость мембран для ионов и органических соединений. Этот процесс связан с образованием комплексов со стеринным компонентом мембраны [29].

Накопление цефотаксима в форменных элементах крови нелинейно зависит от концентрации антибиотика и определяется условиями инкубации [9]. Грамицидин S взаимодействует неспецифически с липидным бислоем мембран разных клеток, нарушая структуру мембран и изменение функциональной активности различных клеток крови при системном применении [11].

Антибиотик-каналообразователь грамицидин А (GRA) формирует в липидном бислое димерную структуру с внутренним диаметром 0,3 нм. Гидрофобные аминокислотные остатки расположены снаружи спирали, а все карбонильные и амидные группы пептидной цепи участвуют в образовании внутри- и межмолекулярных водородных связей. Производительность одиночного канала GRA — до 10^9 ионов/с, что значительно превышает соответствующие показатели для антибиотиков-переносчиков (105 ионов/с). Время жизни GRA канала увеличивается при уменьшении средней толщины мембраны [28].

Аламетицин и родственные соединения (содержащие остатки α -аминоасляной кислоты и фенилаланинола) образуют в мембранах серию ион-про-

водящих агрегатов с числом молекул антибиотика от 6 до 10. Агрегаты меньшего размера проводят только одновалентные катионы; в крупных агрегатах с радиусом 1,5 нм появляется анионная проводимость. Характерной особенностью этих каналов является работа в потенциал-зависимом режиме [28].

Антибиотики-ионофоры растворяются в липидных бислоях и повышают их проницаемость для ионов. Валиномицин способен избирательно увеличивать проницаемость липидных бислоев для ионов щелочных металлов (K^+ , Rb^+ , Cs^+), но очень слабо взаимодействует с ионами Na^+ (слабее в 10^4 – 10^6 раз). Аналогично валиномицину функционируют и другие антибиотики-ионофоры: циклические (энниатиновая группа, переносят ионы K^+ , Na^+ , Cs^+), с незамкнутыми структурами (моненсин, нигерицин, кальцимицин переносят ионы Ca^{2+} , Na^+), макротетралиды (нонактин, монактин) [28].

Антимикробный пептид зервамицин II нарушает ионную проницаемость мембран. Предположительно, он обладает каналообразующей активностью. Было показано, что зервамицин взаимодействует с мембраной преимущественно вогнутой стороной, однако его взаимодействие с мембраной бактериальной клетки энергетически более выгодно [30].

Неантибактериальные эффекты антибиотиков

Различные способы проникновения, механизмов действия и аккумуляции антибиотиков в клетках человека опосредованы их химической структурой и концентрацией в месте действия. Ввиду отсутствия у эукариот специфичных мишеней для антибиотиков, действие последних направлено на самые разные клеточные популяции, в том числе эритроцитарные. Помимо прямого антибактериального действия на инфекционные агенты различной природы, ряду антибиотиков присущи и так называемые неантибактериальные свойства: способность оказывать влияние на метаболизм и структурно-функциональные характеристики клеток различных систем организма [31]. Основное количество работ, имеющихся в литературе, посвящено изучению действия антибиотиков на структурно-функциональное состояние клеточных популяций крови. Это связано с тем, что многим антибиотикам присуща, в частности, иммуномодулирующая активность, и это свойство активно используется в клинической практике. Так, было установлено, что антибиотики фторхинолоны обладают стимулирующим действием на фагоцитарную активность полинуклеаров и макрофагов, способны увеличивать образование перекиси водорода полиморфноядерными лейкоцитами, продукцию интерлейкина-2, поглощение тимидина митоген-стимулированными лимфоцитами, а у больных са-

харным диабетом фторхинолоны способны вызывать дисгликемию [31, 32]. В лечении данного заболевания используются антибиотики сульфаниламиды. В первой половине XX века была случайно обнаружена способность сульфаниламидных препаратов снижать сахар в крови. С тех пор было синтезировано три поколения препаратов сульфаниламочевин, оказывающих гипокликемический эффект за счёт стимулирования высвобождения инсулина из панкреатических β -клеток и повышения чувствительности периферических тканей к инсулину [31].

Антибиотики тетрациклины — иммуномодуляторы, поскольку ингибируют матричные металлопротеазы; способны замедлять выработку защитной слизи, что создаёт предпосылки для образования изъязвлений. В частности, доксициклин гидрохлорид вызывает изъязвление пищевода, что стало основой для запрещения препарата в Швеции. Среди неантибактериальных эффектов доксициклина показано дозозависимое ингибирование выработки цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α и γ -ИФН) и хемокинов [32, 33], изменение адгезии гладкомышечных клеток [34], а применение доксициклина в субтерапевтической дозе может подавлять воспаление и стабилизировать атеросклеротическую бляшку [35]. Распределяясь во многих органах и тканях организма, тетрациклины в высоких концентрациях могут вызвать нарушение синтеза белка и в клетках млекопитающих [22]. Тетрациклины являются средствами с выраженной противовоспалительной активностью и оказывают, кроме того, обезболивающее и жаропонижающее действие [23].

К настоящему времени наиболее полно изучено иммуномодулирующее действие и иные неантибактериальные эффекты макролидов. Данные антибиотики уникальны тем, что благодаря высокой липофильности они активно проникают в клетки, а при воспалительных процессах их поступление в клетки усиливается, вызывая повышение терапевтической эффективности. Первичным механизмом иммуномодулирующего действия макролидов на сегодняшний день принято считать их способность влиять на NF- κ B-и MAPK-зависимые сигнальные пути клеток. Под влиянием кларитромицина отмечено снижение синтеза и/или секреции провоспалительных (IL-1, -6, -8, фактора некроза опухолей (TNF)) и усиление секреции противовоспалительных цитокинов (IL-2, -4, -10) [36]. Кларитромицин метаболизируется с образованием 8 метаболитов, основной из них — 14-ОН кларитромицин — создаёт высокие концентрации в бронхиальном секрете за счёт механизма активного энергозависимого захвата препарата лёгочными клетками [37–39]. При увеличении длительности терапии проникновение кларитромицина в фагоцитирующие клетки возрастает [5, 40]. Кла-

ритромицин обладает и секретолитическим действием [41, 42]. Описаны противовирусные свойства кларитромицина [43].

Благодаря постантибиотическому суб-МПК эффекту рокситромицин способен снижать степень вирулентности некоторых микроорганизмов и накапливаться в нейтрофилах [44, 45]. Данные некоторых работ свидетельствуют о противовоспалительной активности рокситромицина и наличии антиоксидантных свойств, превосходящих кларитромицин и азитромицин [46–48].

Другой представитель макролидов — азитромицин — способен накапливаться в клетках [49]. При длительном назначении низких доз азитромицина отмечено снижение числа лейкоцитов, концентрации острофазовых белков и уровня ИЛ-8. Азитромицин повышает апоптоз нейтрофилов, фагоцитарную активность макрофагов, способствует поддержанию целостности эпителиального барьера дыхательных путей за счёт увеличения электрического сопротивления бронхиального эпителия, что препятствует более глубокой инвазии бактерий и распространению инфекционного процесса [50]. Азитромицин проявляет антипролиферативный и аутофагальный эффекты в отношении гладкомышечных клеток, вызывает уменьшение секреции провоспалительных и повышение продукции противовоспалительных цитокинов, снижение активности провоспалительных факторов транскрипции (F- κ B и AP-1), подавляет продукцию ЛТВ4, вызывает снижение активности глутатион-S-трансферазы [32, 51].

В исследованиях О. Culić [52] доказана зависимость направленности иммуномодулирующего действия макролидов от дозы и/или длительности назначения антибиотика. Лейкоциты способны накапливать макролиды внутри лизосом и выделять антибиотики в концентрациях, достигающих значений МПК или субингибиторных [1, 52]. Установлено, что макролиды имеют сродство с рецептором гормона ЖКТ мотилину, за счёт чего способствуют усилению перистальтики кишечника и желудка [32]. Размер лактонного кольца и степень сродства с ним заместителей, а также положение сахарного остатка определяют различия в антимикробной активности и выраженности побочных желудочно-кишечных эффектов [38]. Показано, что макролиды уменьшают стероидозависимость больных с бронхиальной астмой. Таким образом, основные неантибактериальные эффекты макролидов таковы [53]:

1) Противовоспалительное и иммуномодулирующее действие: угнетение синтеза и секреции провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-6, IL-2, TNF- α и др.); подавление эозинофильного воспаления; повышение продукции глюкокортикостероидов; угнетение образования NO и снижение

выработки свободных радикалов; угнетение хемотаксиса нейтрофилов в очаге воспаления; угнетение адгезии нейтрофилов; повышение эффективности фагоцитоза.

2) Бронходилатационное действие: снижение бронхиальной гиперреактивности; улучшение мукоцилиарного клиренса; снижение секреции слизи бокаловидными клетками бронхов.

Более того, имеются данные о модифицирующем действии полиенового антибиотика макролида амфотерицина В на гемолитическую активность эритроцитов [13]. Изменение структурно-функциональных свойств эритроцитов и их компонентов установлено и для иных представителей макролидов [54].

Линкозамиды распределяются в большинстве тканей организма и стимулируют функции полиморфно-ядерных лейкоцитов [32], а оксазолидиноны могут вызывать серотониновый синдром [55–59].

Использование антимикробных препаратов создаёт селективное давление, способствующее отбору, выживанию и размножению резистентных штаммов. Поэтому антибиотикотерапия зачастую сопровождается рядом побочных эффектов, среди которых основными, присущими практически всем антимикробным препаратам, являются следующие [60, 61]:

- 1) антибиотик-ассоциированная диарея из-за уничтожения нормальной микрофлоры кишечника;
- 2) вагинальный кандидоз и кандидоз полости рта, вызванные, в частности, *Candida albicans*;
- 3) аллергические реакции;
- 4) реакции в месте введения и флебиты.

Таким образом, использование антимикробных средств сопровождается рядом побочных и неантибактериальных эффектов, зачастую не связанных с прямым антимикробным действием препаратов. Описанные выше разнообразные эффекты антибиотиков ещё до конца не исследованы. Особый интерес представляет изучение клинического значения и практического применения антибиотиков в терапии инфекционных процессов различной этиологии. Знание механизмов действия антибиотиков на компоненты клеток эукариот позволит более точно оценить степень их влияния с целью повышения эффективности лечения инфекций с минимальным риском побочных эффектов и прояснит возможные пути повышения их терапевтического индекса.

Результаты собственных исследований

Основываясь на концепции о том, что антибиотикам присущи неантибактериальные эффекты различного рода, нами проведено исследование биофизических механизмов взаимодействия антибиотиков с эукариотическими клетками на примере

модельной системы «антибиотик-эритроцит». В работе использовали антибиотики, применяемые для лечения микоплазменной инфекции (азитромицин (Сумамед, Хорватия) — $1,34 \times 10^{-4}$ моль/л, $1,34 \times 10^{-5}$ моль/л, рокситромицин (Roxithromycin 90%, Sigma-Aldrich) — $7,2 \times 10^{-5}$ моль/л, $7,2 \times 10^{-6}$ моль/л, кларитромицин — $1,33 \times 10^{-4}$ моль/л, $1,33 \times 10^{-5}$ моль/л (Клацид, Abbott S.p.A); джозамицин — $1,21 \times 10^{-4}$ моль/л, $1,21 \times 10^{-5}$ моль/л (Josamycin, Sigma-Aldrich); доксициклин — $7,8 \times 10^{-5}$ моль/л, $7,8 \times 10^{-6}$ моль/л (Doxycycline hyclate 98% (TLC), Sigma-Aldrich); клиндамицин — $1,4 \times 10^{-4}$ моль/л, $1,4 \times 10^{-5}$ моль/л (Clindamycin, Sigma-Aldrich); ципрофлоксацин — $1,21 \times 10^{-4}$ моль/л, $1,21 \times 10^{-5}$ моль/л (Ciprofloxacin, $\geq 98,0\%$ (HPLC) Sigma-Aldrich), офлоксацин — $1,1 \times 10^{-4}$ моль/л, $1,1 \times 10^{-5}$ моль/л (Ofloxacin, Sigma-Aldrich), спарфлоксацин — $1,02 \times 10^{-4}$ моль/л, $1,02 \times 10^{-5}$ моль/л (Sparfloxacin 98% (HPLC) Sigma-Aldrich). Эритроциты и гемоглобин получали из крови доноров, предварительно инкубированной с антибиотиками в течение часа по стандартной методике.

Оценку гемолитической активности эритроцитов под воздействием антибактериальных агентов осуществляли методом осмотического гемолиза. Было установлено, что все изученные антибиотики, за исключением доксициклина, являются слабыми гемолитическими агентами: их активность определяется временем взаимодействия с эритроцитами и концентрацией в инкубационной среде [54].

Известно, что в основе изменения гемолитических свойств клеток лежат процессы химической модификации компонентов эритроцитарных мембран, в частности, структурных белков. В зависимости от особенностей строения мембран эритроциты различных субпопуляций (низко-, средне- и высокостойких) вступают в процесс гемолиза поочередно. Низкостойкие (холестеринообеднённые) эритроциты первыми разрушаются под действием гемолитических факторов уже на начальном этапе взаимодействия с модификатором. Поэтому исходя из данных, полученных методом регистрации осмотических эритрограмм, мы предположили, что антибактериальные агенты при взаимодействии с мембранами эритроцитов индуцируют в них скрытые повреждения, приводящие к изменению структурной жёсткости. Методом сканирующей электронной микроскопии нами показано, что изученные антибиотики способны вызывать гетерогенные изменения в популяциях эритроцитов: выявлено дозозависимое снижение количества двояковогнутых дискоцитов (в среднем на 3–5%, $p \leq 0,05$) и увеличение доли необратимо деформированных эритроцитов относительно контроля [62–64] (рис. 1).

Морфологическим проявлением старения эритроцита является многоступенчатая трансформация дискоцитов в эхиноциты и реже — в

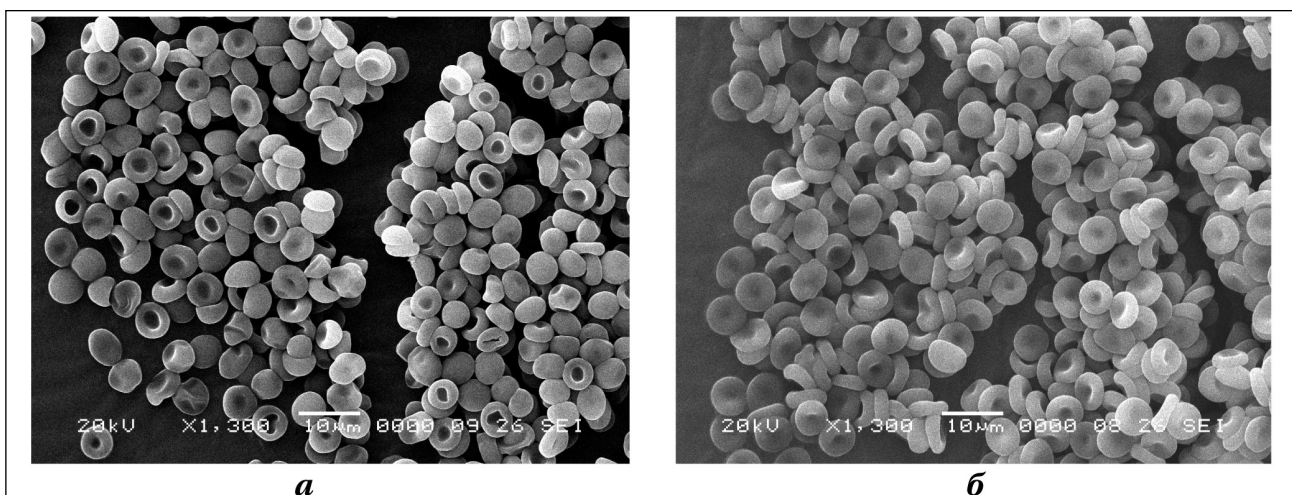


Рис. 1. Поверхностная архитектура эритроцитов, модифицированных азитромицином $1,34 \times 10^{-4}$ моль/л (а) и джозамицином $1,21 \times 10^{-4}$ моль/л (б) (инкубация 60 мин)

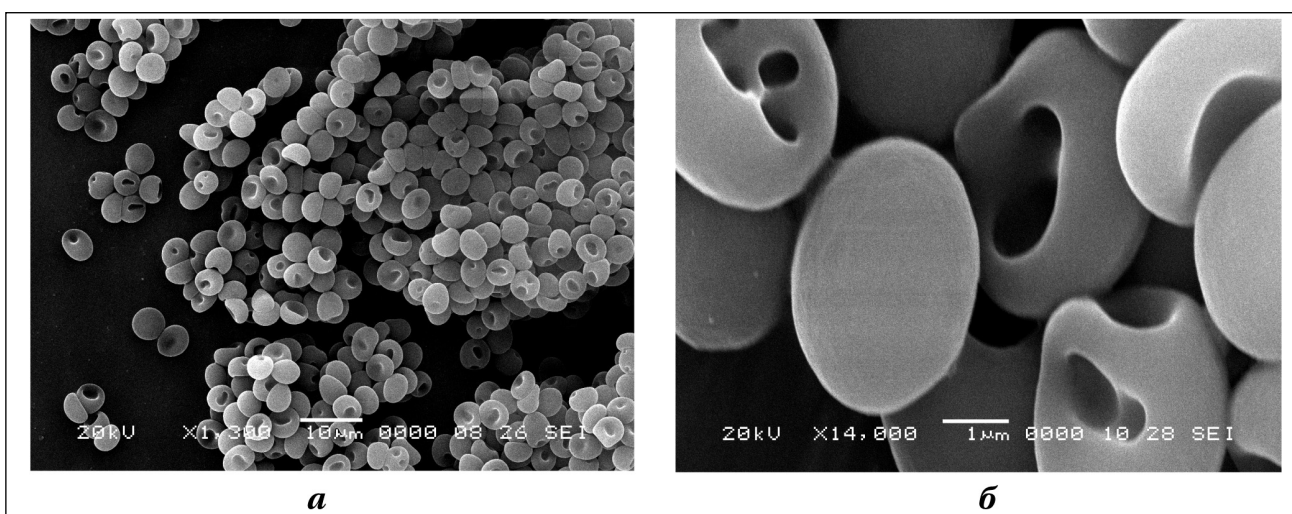


Рис. 2. Поверхностная архитектура эритроцитов, модифицированных доксициклином $7,8 \times 10^{-6}$ моль/л (а) и $7,8 \times 10^{-5}$ моль/л (б) (инкубация 60 мин)

стоматоциты [65, 66], причиной чего служат изменения в цитоскелете и плазмалемме клеток [67]. Эхиноцитарная трансформация, обусловленная образованием перекрёстных сшивок между спектрином и гемоглобином [68], обратима до стадии потери мембранного вещества [69, 70]. На фоне морфологических изменений эритроцитов регистрируются их деэнергизация, нарушения гипоксического характера, целостности и проницаемости мембран [71], деформационных и агрегационных свойств [65, 72, 73]. Появление в присутствии антибиотиков большего относительно контроля количества необратимо деформированных форм эритроцитов указывает на нарушение устойчивости системы на уровне целой клетки, что способствует изменению её функционального состояния, а, следовательно, и способности к упругой деформации в микроциркуляторном русле. Можно констатировать, что ассоциированные с возрастом изменения биофизических показате-

лей мембран эритроцитов количественно отражают закономерные процессы старения организма на клеточном и субклеточном уровнях [74].

По мнению ряда исследователей, изменения плотности и деформируемости эритроцитов являются следствием последовательных процессов дегидратации и микровезикуляции. С внутриклеточными окислительными процессами связывают изменения конфигурации внутренней части тора клеток (пеллора) с образованием условно-полиморфных стом (УПС) [69]. Подобное преобразование эритроцитарного рельефа установлено нами при исследовании поверхностной архитектуры клеток в присутствии доксициклина (рис. 2).

Как следует из представленных микрофотографий, глубина морфологических изменений эритроцитов определяется концентрацией модификатора в инкубационной среде. Нами также установлено, что повреждение эритроцитов в присутствии доксициклина усиливается посте-

пенно [62]. Согласно [75], изменения геометрии тора (фигуры вращения) эритроцита делают клетку дефектной и готовят её к деструкции. Исходя из вышесказанного, морфологически изменённые под действием доксициклина эритроциты мы отнесли к дегенеративным формам. По-видимому, доксициклин, проникая в эритроцит, взаимодействует с белково-липидными компонентами мембран, вызывая формирование в них структурных дефектов, проявляющихся, в конечном итоге, в образовании углублений на их поверхности: дискоциты с обычной округлой зоной пелло-ра сменяются клетками с продолговатыми УПС и УПС отросчато-звездчатой формы. По-видимому, изученные антибиотики индуцируют ускоренное «старение» эритроцитов, приводя к функциональной недостаточности клеток.

Методами абсорбционной спектрофотометрии и протолитометрического титрования нами установлено, что эритроцитарные мембраны проницаемы для изучаемых антибиотиков, что находит отражение в изменении конформационных свойств молекул внутриэритроцитарного гемоглобина: характер воздействия модификатора определяется его химической структурой и концентрацией в инкубационной среде. Связываясь частично или полностью с имидазольными и сульфгидрильными группами, антибиотики вызывают изменения буферных и конформационных свойств белковой глобулы, изменяя тем самым поверхностный заряд белка [76, 77]. При анализе соотношения основных лигандных форм гемоглобина после воздействия антибиотиков выявлено, что данные модификаторы индуцируют снижение количества метгемоглобина (МтНб) в растворе гембелка: наибольшее снижение уровня метгемоглобина до 0,05% ($p \leq 0,05$) индуцировал клиндамицин в концентрации $1,4 \times 10^{-4}$ моль/л, наименьшее снижение — до 2,5% — спарфлоксацин в обеих использованных концентрациях. Таким образом, комплексообразование модификаторов с молекулами гембелка способствует снижению содержания метгемоглобина в клетке: проявляется защитная роль антибиотиков. На основании анализа результатов собственных исследований по изучению влияния антибиотиков различных классов на структурно-функциональное состояние эритроцитарных клеток и данных литературы нами составлена обобщённая концепция процессов формирования структурных изменений эритро-

цитов под воздействием антибактериальных препаратов. Антибиотики, различающиеся по химической структуре, составу и молекулярной массе, способны схожим образом влиять на основные структурно — функциональные характеристики клеточных компонентов эритроцитов. Взаимодействуя с ними, они способствуют накоплению скрытых и явных повреждений, приводящих к изменению функционирования мембрано-связанных ферментов и структурных белков. На клеточном уровне такие процессы могут привести к повышенному внутрисосудистому гемолизу эритроцитов с нарушением гемодинамики периферической крови и транспорта метаболитов, т. е. к снижению способности красных клеток крови выполнять свою главную кислород-транспортную функцию.

Заключение

Таким образом, использование антимикробных препаратов в терапии воспалительных процессов сопровождается проявлением антибиотиками неантибактериальных эффектов различного рода, поэтому выбор антибиотика необходимо проводить с учётом имеющихся у него антимикробных и неантибактериальных свойств. Исследование молекулярно-клеточных механизмов взаимодействия антибиотиков с клетками физиологических систем человека позволит расширить фундаментальные представления о механизмах повреждения мембран и макромолекул соматических клеток при модификации антибиотиками различной природы. В частности, установленные эффекты химической модификации компонентов эритроцитарных мембран особенно важно учитывать при развитии воспалительных процессов различной этиологии, вызывающих ускоренное «старение» эритроцитов (их апоптоз), а, следовательно, и смещение их чувствительности к действию анализируемых антибиотиков. Выявленные нами гетерогенные изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов под воздействием антибиотиков, а также данные литературы подтверждают концепцию типовой реакции эритрона периферического звена на патогенетическое воздействие.

Источники финансирования: работа выполнена в рамках исследовательской деятельности кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ, грантовой поддержки не имеет.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Навашин С.М.* Макро- и микроорганизм — взаимодействие в инфекционном процессе при антибактериальной терапии. Антибиотики и химиотер. — 1998. — № 11. — С. 3–5. / *Navashin S.M.* Makro- i mikroorganizm — vzaimodejstvie v infektsionnom protsesse pri antibakterial'noj terapii. Antibiotiki i khimioter 1998; 11: 3–5. [in Russian]
2. *Грищенко Е.Б.* Роль антимикробной терапии в нарушении микрофлоры кишечника. Методы коррекции. Consilium medicum. — 2011. — № 4. — С. 54–57. / *Grishchenko E.B.* Rol' antimikrobnaj terapii v narushenii mikroflory kishhechnika. Metody korrektsii. Consilium medicum 2011; 4: 54–57. [in Russian]
3. *Страчунский Л.С., Козлов С.Н.* Современная антимикробная химиотерапия. Рук-во для врачей. М.: Боргес; 2002. — 436 с. / *Strachunskij L.S., Kozlov S.N.* Sovremennaya antimikrobnaya khimioterapiya. Ruk-vo dlya vrachej. M.: Borges; 2002; 436. [in Russian]
4. *Страчунский Л.С., Козлов С.Н.* Макролиды в современной клинической практике. Смоленск: Русич, 2007. — 200 с. / *Strachunskij L.S., Kozlov S.N.* Sovremennaya antimikrobnaya khimioterapiya. Ruk-vo dlya vrachej. M.: Borges; 2002; 436. [in Russian]
5. *Labro M.T.* Interference of Antibacterial Agents with Phagocyte Functions: Immunomodulation or «Immuno-Fairy Tales»? Clin Microbiol Rev 2000; 13,4: 615-650.

6. Radafshar G., Torabi F., Mirfarhadi N. Short-term effects of intensive non-surgical periodontal therapy and low-dose doxycycline on serum levels of IL-6, TNF- α and lipid profile in advanced periodontitis. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6, 2: 355–360.
7. Hackl E.V., Berest V.P., Alamouh A., Gatash S.V. Gramicidin S effect on human blood platelets depends on the mobility of membrane lipids. *J Pept Sci* 2006; 12: 1 S1: 227.
8. Hackl E.V., Berest V.P., Alamouh A., Gatash S.V. Interaction of polypeptide antibiotic gramicidin S with platelets. *J Pept Sci* 2012; 18, 12: 748–754.
9. Золотухин О.В., Кузьменко В.В., Золотухина В.Н., Аносова Ю.А., Пивоварова Ю.Ю. Экстракорпоральное насыщение форменных элементов крови антибиотиками для направленного транспорта. Вест ВГУ. Сер Хим Биол Фарм. — 2009. — № 1. — С. 62–66. / Zolotukhin O.V., Kuz'menko V.V., Zolotukhina V.N., Anosova Yu.A., Pivovarova Yu.Yu. Ekstrakorporal'noe насыshchenie formennykh elementov krovi antibiotikami dlya napravlennoogo transporta. Vest VGU. Ser Khim Biol Farm 2009; 1: 62–66. [in Russian]
10. Калашникова И.В. Механизмы взаимодействия антибиотиков пенициллинового ряда с эритроцитами человека. Бюл эксп биол мед. — 2008. — 146. — № 10. — С. 419–423. / Kalashnikova I.V. Mekhanizmy vzaimodejstviya antibiotikov penitsillinovogo ryada s eritrotsitami cheloveka. Bjul eksp biol med 2008; 146: 10: 419–423. [in Russian]
11. Хака Е.В., Берест В.П. Изменение подвижности липидов мембраны влияет на взаимодействие грамицидина S с эритроцитами человека. Биофизич вестн. — 2008. — № 2. — С. 56–63. / Khakl E.V., Berest V.P. Izmenenie podvizhnosti lipidov membrany vliyayet na vzaimodejstvie gramsidina S s eritrotsitami cheloveka. Biofizich vestr 2008; 2: 21: 56–63. [in Russian]
12. Kapur G., Valentini R.P., Mattoo T.K., Imam A.A. Ceftriaxone induced hemolysis complicated by acute renal failure. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 139–142.
13. Knapik-Scrocka A., Bielawski J., Wrzeszcz K., Bochansz A., Nowak K. Modifications of hemolytic activity of polyene antibiotics by mono- and disaccharides in mammalian erythrocytes. *Biol letters* 2007; 44: 1: 17–30.
14. Scaglione F., Rossoni G. Comparative antiinflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: Suppl B: 47–50.
15. Станковская И.М. Побочное действие противомикробных лекарственных средств. М.: Союзмединформ, 1991. — 53 с. / Stankovskaya I.M. Pobochnoe dejstvie protivomikrobnnykh lekarstvennykh sredstv. M.: Sojuzmedinform, 1991; 53. [in Russian]
16. Bikowski J.B. Subantimicrobial dose doxycycline for acne and rosacea. *Skinmed* 2003; 2: 4: 234–245.
17. Bikowski J.B. Subantimicrobial Dose Doxycycline. *Pract Dermatol* 2005; June: 38–43.
18. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. М.: МГУ, 2004. — 528 с. / Egorov N.S. Osnovy ucheniya ob antibiotikakh: Uchebnik. 6-e izd., pererab. i dop. M.: MGU, 2004; 528. [in Russian]
19. Желдакова Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов: Учеб.-метод. комплекс. Мн.: БГУ, 2004. — 111 с. / Zheldakova R.A. Mekhanizmy biosinteza antibiotikov i ikh dejstvie na kletki mikroorganizmov: Ucheb.-metod. kompleks. Mn.: BGU, 2004; 111. [in Russian]
20. Рябова М.А. Лечебная тактика при острой боли в горле. Справочник поликлинического врача. — 2012. — № 8. — С. 39–44. / Ryabova M.A. Lechebnaya taktika pri ostroj boli v gorle. Spravochnik poliklinicheskogo vracha 2012; 8: 39–44. [in Russian]
21. Хоменко А.И., Шадурская А.И. Антибиотики: химиотерапия инфекционных заболеваний. Ростов-на-Дону: Феникс, 2002. — 192 с. / Khomenko A.I., Shadurskaya A.I. Antibiotiki: khimioterapiya infektsionnykh zabolevanij. Rostov-na-Donu: Feniks, 2002; 192. [in Russian]
22. Яковлев С.В. Микробиологические и фармакодинамические факторы, определяющие клинический эффект антибиотикотерапии. Антибиотики и химиотер. — 1999. — № 5. — С. 3–5. / Yakovlev S.V. Mikrobiologicheskie i farmakodinamicheskie faktory, opredelyayushchie klinicheskij effekt antibiotikoterapii. Antibiotiki i khimioter 1999; 5: 3–5. [in Russian]
23. Граник В. Г. Основы медицинской химии. М.: Вузовская книга, 2001 — 384 с. / Granik V. G. Osnovy meditsinskoy khimii. M.: Vuzovskaya kniga, 2001; 384. [in Russian]
24. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. М.: Мир, 1985. — 272 с. / Lanchini D., Parenti F. Antibiotiki. M.: Mir, 1985; 272. [in Russian]
25. Pascual, A., Garcia I., Perea E. J. Fluorometric measurement of ofloxacin uptake by human polymorphonuclear leucocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 653–656.
26. Byrani, G.K., Stokes D.C., Fishman M., Shenep J.L., Hildner W.K., Rufus K. et al. Binding of polymyxin B to rat alveolar macrophages. *J Infect Dis* 1990; 162: 939–942.
27. Mtairag, E.M., Abdelghaffar H., Douhet C., Labro M.T. Role of extracellular calcium in *in vitro* uptake and intraphagocytic location of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1574–1579.
28. Брагина Н.А., Миронов А.Ф. Мембранология: учеб. пособие. М.: ИПЦ МИТХТ, 2002. — 98 с. / Bragina N.A., Mironov A.F. Membranologiya: ucheb. posobie. M.: IPTs MITKhT, 2002; 98. [in Russian]
29. Самедова А.Г., Гусейнова К.Ф., Салимова А.М. Механизм действия мембраноактивного полиенового антибиотика филипина. Здоровье. Мед. экология. Наука. 2009. — С. 4–5: 163–165. / Samedova A.G., Guseynova K.F., Salimova A.M. Mekhanizm dejstviya membranoaktivnogo polienovogo antibiotika filipina. Zdorov'e. Med. ekologiya. Nauka 2009; 4–5: 163–165. [in Russian]
30. Левцова О.В. Молекулярный дизайн новых пептидных антибиотиков на основе актиномицина Д и зеррамицина II. Материалы научно-практической конференции в рамках международной научно-образовательной школы-конференции по биоинженерии и приложению, М.: 2007. — С. 49–50. / Levtsova O.V. Molekulyarnyj dizajn novykh peptidnykh antibiotikov na osnove aktinomitsina D i zervamitsina II. Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii v ramkakh mezh-dunarodnoj nauchno-obrazovatel'noj shkoly-konferentsii po bioinzhenierii i prilozheniyam, 2007; Moskva: 2007; 49–50. [in Russian]
31. Pasquale T.R., Tan J.S. Nonantimicrobial effects of antibacterial agents. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1: 127–135.
32. Симонов С.С. Неантибактериальные эффекты антибиотиков. Здоровья України. — 2007. — № 5. — С. 22–23. / Simonov S.S. Neantibakterial'nye efekty antibiotikov. Zdorov'ya Ukraini 2007; 5: 22–23. [in Russian]
33. Krakauer T., Buckley M. Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. *Antimicrob Agent Chemother* 2003; 47, 11: 3630–3633.
34. Franco C., Ho B., Mulholland D., Hou G., Islam M., Donaldson K. et al. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am J Pathol* 2006; 168: 1697–1709.
35. Brown D.L., Desai K.K., Vakili B.A., Nouneh C., Lee H.M., Golub L.M. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 733–738.
36. Yakovleva O., Ilchenko A. The topical issues of clinical pharmacology of clarithromycin. *News of pharmacy* 2015; 3 (83): 71–75.
37. Hardy D.J., Swanson R.N., Rode R.A., Marsh K., Shipkovitz N.L. et al. Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* activities of clarithromycin against *H.influenzae* by 14-hydroxy-clarithromycin its major metabolite in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1407–1413.
38. Scaglione F., Demartini G., Fraschini F. Distribution of clarithromycin to intracellular and extracellular sites of infection: an overview. In: New Macrolides, Azalides, and Streptogramins in Clinical Practice. Neu H.C., Young L.S., Zinner S.H., Acar J.F. [Eds.]. New York, etc., 1995; 380–385.
39. Valle E., Azoulay-Dupuis A., Swanson R., Bergogne-Be're'zin E., Pocard J.J. Individual and combined activities of clarithromycin and its 14-hydroxy metabolite in a murine model of Haemophilus influenzae infection. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27: 31–41.
40. Rodvold K.A. Clinical pharmacokinetics of clarithromycin. *Clin Pharmacokinet* 1999; Nov: 37 (5): 385–398.
41. Banerjee D. The effects of oral clarithromycin on airway inflammation in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a double blind randomized controlled study [abstract]. *Eur Respir J* 2001; 18: 338.
42. Basygt I., Yildiz F., Ozkara S.K., Yildirim E.Ö., Boyaci H., Ilgazli A. The effect of clarithromycin on inflammatory markers in chronic obstructive pulmonary disease. Preliminary data. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1400–1405.
43. Лешенко С.И. Значение неантибактериальных эффектов макролидов в лечении больных ХОЗЛ. Укр пульмонол ж-л. — 2010. — № 1. — С. 21. / Leshchenko S.I. Znachenie neantibakterial'nykh effektivov makrolidov v lechenii bol'nykh KhOZL. Ukr pul'monol zh-l 2010; 1: 21.
44. Moneib N.A., Shibl A.M., El-Said M.A., El-Masry E.M. Macrolides induced suppression of virulence factors produced by *Staphylococcus aureus*. *J Chemother* 1993; 5: 289–292.
45. Rosales M., Domínguez V., Bonacho I., Vidal X. Roxithromycin versus doxycycline in the treatment of *Chlamydia trachomatis* cervicitis in asymptomatic women. *Rev Clin Esp* 1993; 192: 6: 253–255.
46. Konno S., Hara K., Matsumoto F. A review of Japanese studies of roxithromycin. Pharmacokinetics, microbiology and clinical studies, particularly in the treatment of respiratory infection. *Drug Invest* 1993; 5: 93–97.
47. Konno S., Asano K., Kurokawa M., Ikeda K., Okamoto K., Adachi M. Antiasthmatic activity of a macrolide antibiotic: analysis of possible mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1994; 105: 308–316.
48. Scaglione F., Rossini G. Comparative antiinflammatory effect of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. In: The 3rd International Conference on the Macrolides, Azalides and Streptogramins, Lisbon, 1996: abstr. 9.04.
49. Jaffe A., Francis J., Rosenthal M., Bush A. Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* 1998; 8: 1270–1271.
50. Asgrimsson V., Gudjonsson T., Gudmundsson G.H., Baldursson O. Novel effects of azithromycin on tight junction proteins in human airway epithelia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1805–1812.
51. Parnham M.J., Culić O., Eraković V., Munic V., Popovic-Grle S., Barisic K. et al. Modulation of neutrophil and inflammation markers in chronic obstructive pulmonary disease by short-term azithromycin treatment. *Eur J Pharmacol* 2005; 517 (1–2): 132–143.

52. Culić O., Eraković V., Cepelak I., Barisić K., Brajsa K., Ferencić Z. et al. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol* 2002; 450 (3): 277–289.
53. Матвеев В.А. Неантибактериальные эффекты макролидных антибиотиков. Леч дело. — 2011. — т. 22. — № 6. С. 51. / *Matveev V.A.* Neantibakterial'nye efekty makrolidnykh antibiotikov. *Lech delo* 2011; 6 (22): 51. [in Russian]
54. Баева Е.С., Резван С.Г., Артюхов В.Г. Влияние антибактериальных препаратов на осмотическую резистентность эритроцитов человека. Экспер клин фармакол. — 2013. — Т. 76. — № 12 (1–42). — С. 20–23. / *Baeva E.S., Rezvan S.G., Artyukhov V.G.* Vliyanie antibakterial'nykh preparatov na osmoticheskuyu rezistentnost' eritrotsitov cheloveka. *Ekspier klin farmakol* 2013; 76: 12 (1–42): 20–23. [in Russian]
55. Diekema DJ., Jones R.N. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet* 2001; 358: 1975–1982.
56. Goldstein E.J.C., Citron D.M., Meeriam C.V. Linezolid activity compared to those of selected macrolides and other agents against aerobic and anaerobic pathogens isolated from soft tissue bite infections in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1469–1474.
57. Jones R.N., Johnson D.M., Erwin M.E. In vitro antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766 two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 720–726.
58. Norrby R. Linezolid — a review of the first oxazolidinone. *Exp Opin Pharmacother* 2001; 2, 2: 293–302.
59. Shinabarger D.L., Marotti K.R., Murray R.W., Lin A.H., Melchior E.P., Swaney S.M. et al. Mechanism of action of the oxazolidinones: effects of linezolid and eperzolid on translation reactions. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2132–2136.
60. Shehab N., Patel P., Srinivasan A., Budnitz D.S. Emergency department visits for antibiotic-associated adverse events. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 735–743.
61. Bartlett J.G. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002; 346: 334–339.
62. Баева Е.С., Артюхов В.Г. Изучение методом сканирующей электронной микроскопии поверхностной архитектоники эритроцитов человека в присутствии доксициклина. Бюл эксперим биол мед. — 2013. — № 3. — С. 107–111. / *Baeva E.S., Artyukhov V.G.* Izuchenie metodom skaniruyushchej elektronnoj mikroskopii poverkhnostnoj arkhitektoniki eritrotsitov cheloveka v prisutstvii doksitsiklina. *Bjyul eksperim biol med* 2013; 3: 107–111.
63. Баева Е.С., Артюхов В.Г. Влияние антибиотиков класса макролиды на цитоархитектуру эритроцитов человека. Теория и практика современной науки. Материалы XI международной научно-практической конференции, М.: 8–9 октября, 2013; С. 20–26. / *Baeva E.S., Artyukhov V.G.* Vliyanie antibiotikov klassa makrolidy na tsitoarkhitektoniku eritrotsitov cheloveka. *Teoriya i praktika sovremennoj nauki. Materialy XI mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferentsii*, Moskva: 8–9 oktyabrya, 2013; 20–26. [in Russian]
64. Баева Е.С., Артюхов В.Г. Влияние фторхинолонов на цитоархитектуру эритроцитов человека. Инновации в науке. Сборник статей по материалам XXV международной научно-практической конференции, Новосибирск, сентябрь 2013. — С. 16–23. / *Baeva E.S., Artyukhov V.G.* Vliyanie ftorkhinolonov na tsitoarkhitektoniku eritrotsitov cheloveka. *Innovatsii v nauke. Sbornik statej po materialam XXV mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferentsii*, sentyabr', Novosibirsk, 2013: 16–23. [in Russian]
65. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и её изменения при патологиях разного генеза. Бюл ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — № 3 (73). — С. 334–354. / *Borovskaya M.K., Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Koryakina L.B., Kuril'skaya T.E., Pivovarov Yu.I.* Strukturno-funktsional'naya kharakteristika membrany eritrotsita i ee izmeneniya pri patologiyakh raznogo geneza. *Bjyul VSN Ts SO RAMN* 2010; 3 (73): 334–354. [in Russian]
66. Марачев А.Г., Лагшанский А.Г. Физиологические аспекты адаптивных модификаций липидов биомембран у человека в условиях Севра. Физиол человека. — 1986. — Т. 15. — № 6. — С. 46–55. / *Marachev A.G., Lagshanskij A.G.* Fiziologicheskie aspekty adaptivnykh modifikatsij lipidov biomembran u cheloveka v usloviyakh Severa. *Fiziol cheloveka* 1986; 15: 6: 46–55. [in Russian]
67. Cohen C.M. The molecular organization of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 1983; 20: 141–158.
68. Snyder L.M., Fortier N.L., Trainor J., Jacobs J., Leb L., Lubin B. et al. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J Clin Invest* 1985; 76: 5: 1971–1977.
69. Кудалов В.Н., Хадарцев А.А., Якушина Г.Н. Саногенез и саногенные реакции эритрона. Проблемы медицины и общее представление о саногенезе. Вест Нов Мед Технологий. — 2005. — Т. 12. — № 3–4. — С. 5–10. / *Kidalov V.N., Khadartsev A.A., Yakushina G.N.* Sanogenez i sanogen-nye reaksii eritrona. *Problemy meditsiny i obshchee predstavlenie o sanogenezе*. *Vest Nov Med Tekhnologii* 2005; 12, 3–4: 5–10. [in Russian]
70. Козинец Г.И., Симовапт Ю. Поверхностная архитектура клеток периферической крови. Таллин: Валгус, 1984. — 116 с. / *Kozinets G.I., Simovart Yu.* Poverkhnostnaya arkhitektonika kletok perifericheskoy krvi. *Tallin: Valgus*, 1984; 116. [in Russian]
71. Бархина Т.Г., Никитина Г.М., Бархина М.М., Черных А.С. Патология мембран форменных элементов крови при заболеваниях и в эксперименте. Успехи совр естеств. — 2006. — № 6. — С. 64–65. / *Barkhina T.G., Nikitina G.M., Barkhina M.M., Chernykh A.S.* Patologiya membran formennykh elementov krvi pri zabolevaniyakh i v eksperimente. *Uspekhi sovr estestv* 2006; 6: 64–65. [in Russian]
72. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Кравец Е.Б., Иванов В.В. и др. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы. Бюл сиб медицины. — 2006. — № 2. — С. 62–69. / *Novitskij V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Fedorova T.S., Kravets E.B., Ivanov V.V. i dr.* Molekulyarnye narusheniya membrany eritrotsitov pri patologii raznogo geneza yavlyayutsya tipovoy reaksiej organizma: kontury problemy. *Bjyul sib meditsiny* 2006; 2: 62–69. [in Russian]
73. Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Колосова М.В., Новицкий В.В. Типовая реакция периферического звена эритрона при патологических процессах. Бюл сиб медицины. — 2002. — № 1. — С. 29–35. / *Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Kolosova M.V., Novitskij V.V.* Tipovaya reaktiya perifericheskogo звена eritrona pri patologicheskikh protsessakh. *Bjyul sib meditsiny* 2002; 1: 29–35. [in Russian]
74. Бадалян К.Р., Василенко И.А., Федин А.И. Биофизические свойства эритроцитов периферической крови у больных с хронической ишемией мозга. Лечебное дело. — 2015. — № 1. — С. 84–90. / *Badalyan K.R., Vasilenko I.A., Fedin A.I.* Biofizicheskie svoystva eritrotsitov perifericheskoy krvi u bol'nykh s khronicheskoy ishemiej mozga. *Lechebnoe delo* 2015; 1: 84–90. [in Russian]
75. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Красников А.В., Краснова Л.С., Чаниева М.И. Геометрия прегемолитических пойкилоцитов в стандартных центрифугах крови на предметных стеклах. Гематол трансфузиол. — 2008. — № 6. — С. 22–26. / *Kozinets G.I., Pogorelov V.M., Krasnikov A.V., Krasnova L.S., Chanieva M.I.* Geometriya pregemoliticheskikh pojkilotsitov v standartnykh tsentrifugakh krvi na predmetnykh steklakh. *Gematol transfuziol* 2008; 6: 22–26. [in Russian]
76. Баева Е.С., Артюхов В.Г. Изучение механизмов взаимодействия антибиотиков различных классов с гемоглобином. Вест ВГУ: сер Хим Биол Фарм. — 2012. — № 2. — С. 119–124. / *Baeva E.S., Artyukhov V.G.* Izuchenie mekhanizmov vzaimodejstviya antibiotikov razlichnykh klassov s gemoglobinom. *Vest VGU: ser Khim Biol Farm* 2012; 2: 119–124. [in Russian]
77. Баева Е.С., Артюхов В.Г. Влияние антибиотиков класса фторхинолоны на структурное состояние гемоглобина человека. Вopr биол, мед и фарм химии. — 2013. — № 7. — С. 44–47. / *Baeva E.S., Artyukhov V.G.* Vliyanie antibiotikov klassa ftorkhinolony na strukturnoe sostoyanie gemoglobina cheloveka. *Vopr biol, med i farm khimii* 2013; 7: 44–47. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Баева Елена Сергеевна — к. б. н., ассистент кафедры нормальной физиологии, Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко, Воронеж

Артюхов Валерий Григорьевич — д. б. н., профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Указатель авторов и статей, опубликованных в журнале в 2019 году

- Абакумова Т. В. см. Долгова Д. Р. и др. 5–6 (18–21)
 Авдеев С. Н. см. Брико Н. И. и др. 1–2 (37–43)
 Агафонов А. П. см. Скарнович М. А. и др. 11–12 (25–30)
 Айдакова А. В. см. Иванов И. С. и др. 11–12 (8–15)
 Алехин А. В., Арутюнов Г. П., Багненко С. Ф., Баялиева А. Ж., Журавлева М. В., Каприн А. Д., Котенко О. Н., Крылов В. В., Мирошниченко Ю. В., Молчанов И. В., Натаров С. В., Петрайкина Е. Е., Полушин Ю. С., Проценко Д. Н., Скопец А. А., Сидоренко С. В., Щеголев А. В., Хубутия М. Ш., Юдин С. М., Яковлев С. В. Резолюция Совета экспертов по вопросу использования ингибиторозащищённых бета-лактамов в лечении внебольничных и нозокомиальных инфекций 1–2 (34–36)
 Алиева К. Н., Голикова М. В., Портной Ю. А., Фирсов А. А. Комбинированная терапия как путь к предотвращению антибиотикорезистентности бактерий: линезолид–даптомицин против *Staphylococcus aureus* 9–10 (8–13)
 Андреева И. В., Стецюк О. У., Довгань Е. В., Соловьева Л. М. Непреднамеренная передозировка азитромицина и длительная терапия амоксциллином/клавуланатом без развития гепатотоксического действия у пациентки с сахарным диабетом I типа: описание случая 7–8 (31–33)
 Андриков Б. Г., Михайлов В. В., Беседнова Н. Н. Антимикробная активность вторичных метаболитов морских бактерий 7–8 (44–55)
 Андриков Б. Г. см. Беседнова Н. Н. и др. 11–12 (54–67)
 Аникеев А. С. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Анисимова С. Г. см. Мазина Н. К. 9–10 (44–49)
 Антонеева И. И. см. Долгова Д. Р. и др. 5–6 (18–21)
 Антосюк О. Н., Пайдиева К. Т. Изменение токсических свойств метотрексата при воздействии экстремальных температур в период развития *Drosophila melanogaster* 7–8 (13–18)
 Арамисова Р. М. см. Балоева Д. А. и др. 11–12 (35–38)
 Артюхов В. Г. см. Баева Е. С. 11–12 (72–80)
 Арутюнов Г. П. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Асецкая И. Л. см. Кузьмина А. В. и др. 11–12 (48–53)
 Ахмедова Д. А. см. Беляков С. В. и др. 9–10 (21–25)
 Багненко С. Ф. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Баева Е. С., Артюхов В. Г. Пути реализации неантибактериальных эффектов антибиотиков, широко применяемых в клинической практике 11–12 (72–80)
 Байбулатова Е. А. см. Зырянов С. К. 3–4 (81–91)
 Балоева Д. А., Этезова Ж. Б., Камбачокова З. А., Арамисова Р. М., Пишкова Е. М., Гурижева М. В., Габаева М. М. Региональные особенности микробного пейзажа в отделении реанимации и интенсивной терапии 11–12 (35–38)
 Баялиева А. Ж. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Беланов С. С. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Белов Б. С., Тарасова Г. М., Буханова Д. В. Коморбидные инфекции при ревматических заболеваниях 1–2 (50–57)
 Белов Б. С., Тарасова Г. М., Муравьева Н. В. Роль прокальцитонинового теста в диагностике бактериальных инфекций при ревматических заболеваниях 3–4 (92–96)
 Белов Б. С., Тарасова Г. М., Буханова Д. С. Профилактика пневмоцистной пневмонии у пациентов с ревматическими заболеваниями: проблемы и поиск решений 5–6 (77–84)
 Белькова Ю. А. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Беляков С. В., Кедик С. А., Шаталов Д. О., Ахмедова Д. А., Деменюк П. Ю. Исследование хронической токсичности субстанции «Разветвлённый олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид» при орошении полости рта 9–10 (21–25)
 Берлизова М. В. см. Крылова Н. В. и др. 11–12 (16–24)
 Беседнова Н. Н., Крыжановский С. П., Звягинцева Т. Н., Персиянова Е. В., Корнеева И. А. Полисахариды морских водорослей в коррекцинарушений, связанных с метаболическим синдромом 3–4 (59–70)
 Беседнова Н. Н. см. Запорожец Т. С. и др. 5–6 (32–38)
 Беседнова Н. Н. см. Андриков Б. Г. и др. 7–8 (44–55)
 Беседнова Н. Н. см. Смолина Т. П. и др. 9–10 (3–7)
 Беседнова Н. Н., Ермакова С. П., Кузнецова Т. А., Макаренко И. Д., Крыжановский С. П., Андриков Б. Г., Запорожец Т. С. Морские водоросли и сахарный диабет 2 типа: новые стратегии в терапии 11–12 (54–67)
 Бикмиева А. В. см. Брико Н. И. и др. 1–2 (37–43)
 Бобылев А. В. см. Рачина С. А. и др. 3–4 (38–47)
 Боднев С. А. см. Пьянков О. В. и др. 5–6 (3–8)
 Борисевич С. В. см. Черникова Н. К. и др. 1–2 (9–13)
 Борисевич С. В. см. Логинова С. Я. и др. 5–6 (13–17)
 Борисевич С. В. см. Логинова С. Я. и др. 7–8 (19–23)
 Борисевич С. В. см. Петров А. А. и др. 7–8 (56–62)
 Борисевич С. В. см. Сизикова Т. Е. и др. 9–10 (50–55)
 Борисевич С. В. см. Логинова С. Я. и др. 11–12 (31–34)
 Бормотов Н. И. см. Скарнович М. А. и др. 11–12 (25–30)
 Бородин И. А. см. Гулий О. И. и др. 1–2 (3–8)
 Брико Н. И., Фельдблюм И. В., Бикмиева А. В., Авдеев С. Н., Драпкина О. М., Игнатова Г. Л., Демко И. В., Жестков А. В. Вакцинопрофилактика взрослого населения против пневмококковой инфекции 1–2 (37–43)
 Буданова Е. В., Горленко К. Л., Киселев Г. Ю. Вторичные метаболиты растений: механизмы антибактериального действия и перспективы применения в фармакологии 5–6 (69–76)
 Будорагин И. Е. см. Зайцев А. А. и др. 1–2 (44–49)
 Бурасова Е. Г. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Буханова Д. В. см. Белов Б. С. и др. 1–2 (50–57)
 Буханова Д. В. см. Белов Б. С. и др. 5–6 (77–84)
 Васильева Е. И. см. Соколова В. И. и др. 9–10 (26–32)
 Веревищев В. К., Шемякина Е. К., Сабитов А. У., Хаманова Ю. Б. Возможности этиотропной терапии при гриппе и ОРВИ с учётом срока госпитализации больных в стационар и риска развития вторичных осложнений 3–4 (10–13)
 Ветрова Е. Н. см. Зайцев А. А. и др. 1–2 (44–49)
 Власенко Н. Ю. см. Савченко О. А. и др. 1–2 (20–25)
 Волкова М. О. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Володина А. А. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Габаева М. М. см. Балоева Д. А. и др. 11–12 (35–38)
 Гаж А. К. см. Смолина Т. П. и др. 9–10 (3–7)
 Ганапольский В. П., Матыцин В. О., Гринчук С. С., Ятманов А. Н., Лопатина В. Ф., Запутанов В. А. Возможности и перспективы применения цитофлавина для повышения резервов адаптации специалистов, работающих в горных условиях 5–6 (49–53)
 Генинг С. О. см. Долгова Д. Р. и др. 5–6 (18–21)
 Генинг Т. П. см. Долгова Д. Р. и др. 5–6 (18–21)
 Готов А. Г. см. Королева Л. С. и др. 7–8 (3–7)
 Глотова Т. И. см. Королева Л. С. и др. 7–8 (3–7)
 Голикова М. В. см. Алиева К. Н. и др. 9–10 (8–13)
 Гонношенко В. Н. см. Фоминых С. Г. и др. 7–8 (24–30)
 Горленко К. Л. см. Буданова Е. В. и др. 5–6 (69–76)
 Гостев В. В. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Грамматикова Н. Э. см. Иванов И. С. и др. 11–12 (8–15)
 Гринчук С. С. см. Ганапольский В. и др. 5–6 (49–53)
 Гулий О. И., Зайцев Б. Д., Караваева О. А., Ловцова Л. Г., Мехта С. К., Бородин И. А. Экспресс-анализ чувствительности бактерий к бета-лактамам антибиотикам с помощью резонатора с поперечным электрическим полем 1–2 (3–8)
 Гурижева М. В. см. Балоева Д. А. и др. 11–12 (35–38)
 Гурина С. В. см. Фролова В. В. и др. 11–12 (3–7)
 Данилов А. И. см. Фоминых С. Г. и др. 7–8 (24–30)
 Данилов А. И., Козлов С. Н., Жаркова Л. П., Евсеев А. В., Младов В. В. Инъекционная наркомания как фактор риска инфекционного эндокардита 9–10 (39–43)

- Деменюк П. Ю. см. Беляков С. В. и др. 9–10 (21–25)
 Демко И. В. см. Брико Н. И. и др. 1–2 (37–43)
 Дехисси Е. И. см. Липатов К. В. и др. 5–6 (39–43)
 Довгань Е. В. см. Андреева И. В. и др. 7–8 (31–33)
 Долгова Д. Р., Генинг Т. П., Абакумова Т. В., Генинг С. О., Антонеева И. И., Песков А. Б., Федотова А. Ю. Маркеры первичной химиорезистентности эпителиальных клеток асцит у больных раком яичников 5–6 (18–21)
 Драпкина О. М. см. Брико Н. И. и др. 1–2 (37–43)
- Евсеев А. В. см. Данилов А. И. и др. 9–10 (39–43)
 Ежова Л. Г. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Елохина Е. В. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Ермакова С. П. см. Беседнова Н. Н. и др. 11–12 (54–67)
 Ефименко Т. А., Терехова Л. П., Ефременкова О. В. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий 5–6 (64–68)
 Ефременкова О. В. см. Ефименко Т. А. и др. (5–6) (64–68)
- Жаркова Л. П. см. Данилов А. И. и др. 9–10 (39–43)
 Жестков А. В. см. Брико Н. И. и др. 1–2 (37–43)
 Жукова О. В. см. Кисина В. И. и др. 3–4 (31–37)
 Журавлева М. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Журавлева М. В., Кукушкин Г. В., Свиридкина Л. П., Юров Д. Е., Каменева Т. Р. Экспериментальное изучение фармакокинетики цефотаксима при совместном введении с препаратами, обладающими гиалуронидазной активностью 5–6 (9–12)
- Зайковская А. В. см. Пьянков О. В. и др. 5–6 (3–8)
 Зайцев А. А., Будорагин И. Е., Исаева Е. И., Ветрова Е. Н., Тюшева В. В., Иванова Н. А. Фармакотерапия острого бронхита: расставляем приоритеты 1–2 (44–49)
 Зайцев Б. Д. см. Гулий О. И. и др. 1–2 (3–8)
 Запутанов В. А. см. Гананольский В. и др. 5–6 (49–53)
 Запорожец Т. С., Крыжановский С. П., Персиянова Е. В., Кузнецова Т. А., Шутикова А. Л., Шевченко Н. М., Беседнова Н. Н. Эффективность применения фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* при вакцинации против сезонного гриппа у пожилых людей 5–6 (32–38)
 Запорожец Т. С. см. Беседнова Н. Н. и др. 11–12 (54–67)
 Захаренков И. А. см. Рачина С. А. и др. 3–4 (38–47)
 Звягинцева Т. Н. см. Беседнова Н. Н. и др. 3–4 (59–70)
 Зырянов С. К., Байбулатова Е. А. Использование новых лекарственных форм антибиотиков как путь повышения эффективности и безопасности антибактериальной терапии 3–4 (81–91)
 Зырянов С. К. см. Кузьмина А. В. и др. 11–12 (48–53)
- Иванкова Т. Д. см. Синева О. Н. и др. 3–4 (3–9)
 Иванов И. С., Шаталов Д. О., Кедик С. А., Седишев И. П., Граматикова Н. Э., Айдакова А. В., Трачук К. Н., Языкова Е. И. Изучение действия фармацевтической субстанции гидросукцинат разветвленного олигогексаметиленгуанидина в отношении микроорганизмов 11–12 (8–15)
 Иванова К. А. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Иванова Н. А. см. Зайцев А. А. и др. 1–2 (44–49)
 Иванушко Л. А. см. Смолина Т. П. и др. 9–10 (3–7)
 Игнатова Г. Л. см. Брико Н. И. и др. 1–2 (37–43)
 Исаева Е. И. см. Зайцев А. А. и др. 1–2 (44–49)
- Казakov В. см. Пьянков О. В. и др. 5–6 (3–8)
 Калиногорская О. С. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Калисникова Е. Л. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Кальченко Е. В. см. Фоминых С. Г. и др. 7–8 (24–30)
 Камбачокова З. А. см. Балоева Д. А. и др. 11–12 ()
 Каменева Т. Р. см. Журавлева М. В. и др. 5–6 (9–12)
- Каприн А. Д. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Караваева О. А. см. Гулий О. И. и др. 1–2 (3–8)
 Кедик С. А. см. Беляков С. В. и др. 9–10 (21–25)
 Кедик С. А. см. Иванов И. С. и др. 11–12 (8–15)
 Киришина И. А. см. Савченко О. А. и др. 1–2 (20–25)
 Киселев Г. Ю. см. Буданова Е. В. и др. 5–6 (69–76)
 Кисина В. И., Романова И. В., Жукова О. В., С. В. Яковлев С. В. Сравнительный анализ современных подходов к лечению *M.genitalium*-инфекции в клинической практике 3–4 (31–37)
 Коваленко А. Л. см. Коломиец В. М. и др. 5–6 (44–48)
 Коваленко А. Л. см. Коломиец В. М. и др. 11–12 (68–71)
 Козлов Р. С. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Козлов С. Н. см. Данилов А. И. и др. 9–10 (39–43)
 Коломиец В. М., Коваленко А. Л., Таликова Е. В. Эффективность использования ремаксолола в терапии сопровождения при запущенном туберкулезе 5–6 (44–48)
 Коломиец В. М., Коваленко А. Л., Таликова Е. В. Интенсификация этиотропной терапии туберкулеза иммуномодуляторами в условиях патоморфоза заболевания 11–12 (68–71)
 Комарова Е. А. см. Липатов К. В. и др. 5–6 (39–43)
 Корнеева И. А. см. Беседнова Н. Н. и др. 3–4 (59–70)
 Корниенко С. В. см. Пригулина Ю. Г. и др. 3–4 (25–30)
 Королева Л. С., Яринич Л. А., Семенова О. В., Глотов А. Г., Глотова Т. И., Сильников В. Н. Синтез и противовирусная активность бисгистидилдиаминоалканов в отношении *Feline calicivirus* 7–8 (3–7)
 Котенко О. Н. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Кочеровец В. И. Актуальные вопросы теории и практики применения топических препаратов метронидазола в дерматологии 7–8 (38–43)
 Крыжановский С. П. см. Беседнова Н. Н. и др. 3–4 (59–70)
 Крыжановский С. П. см. Запорожец Т. С. и др. 5–6 (32–38)
 Крыжановский С. П. см. Беседнова Н. Н. и др. 11–12 (54–67)
 Крылов В. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Крылова Н. В., Смолина Т. П., Берлизова М. В., Леонова Г. Н. Иммунокорригирующая и противовирусная активность полисахарида из морских бактерий в отношении вируса клещевого энцефалита 11–12 (16–24)
 Кузнецова Т. А. см. Запорожец Т. С. и др. 5–6 (32–38)
 Кузнецова Т. А. см. Смолина Т. П. и др. 9–10 (3–7)
 Кузнецова Т. А. см. Беседнова Н. Н. и др. 11–12 (54–67)
 Кузьмина А. В., Асеева И. Л., Поливанов В. А., Зырянов С. К. Медицинские ошибки при применении бета-лактамов антибиотиков: анализ российской базы спонтанных сообщений 11–12 (48–53)
 Кузьмина Т. Н., Рогова Н. В. Стратификация факторов, влияющих на эффективность антибактериальной терапии раневых дефектов при синдроме диабетической стопы 9–10 (33–38)
 Кукушкин Г. В. см. Журавлева М. В. и др. 5–6 (9–12)
- Лазаренко Л. Н. см. Орябинская Л. Б. и др. 9–10 (14–20)
 Лебедев В. Н. см. Петров А. А. и др. 7–8 (56–62)
 Лебедев В. Н. см. Сизикова Т. Е. и др. 9–10 (50–55)
 Леонова Г. Н. см. Крылова Н. В. и др. 11–12 (16–24)
 Лесная О. А. см. Стуров Н. В. и др. 7–8 (69–74)
 Липатов К. В., Комарова Е. А., Хрупкин В. И., Черкасов Ю. Е., Мирская М. А., Дехисси Е. И. Характеристика возбудителей у пациентов с карбункулами и особенности антибактериальной химиотерапии 5–6 (39–43)
 Ловцова Л. Г. см. Гулий О. И. и др. 1–2 (3–8)
 Логинова С. Я., Шукина В. Н., Борисевич С. В., Хамитов Р. А., Максимов В. А. Изучение эффективности Ларифана® при экспериментальной форме тяжелого острого респираторного синдрома 5–6 (13–17)
 Логинова С. Я., Шукина В. Н., Борисевич С. В., Хамитов Р. А., Максимов В. А., Шустер А. М. Изучение эффективности Арбидола® при экспериментальной форме тяжелого острого респираторного синдрома 7–8 (19–23)

Логинова С. Я., Шукина В. Н., Борисевич С. В., Хамитов Р. А., Максимов В. А. Изучение эффективности Ридостина® при экспериментальной форме тяжёлого острого респираторного синдрома 11–12 (31–34)
 Лопатина В. Ф. см. Ганапольский В. и др. 5–6 (49–53)
 Любасовская Л. А. см. Сердюкова Д. М. и др. 11–12 (39–47)

Мазин П. В. см. Мазина Н. К. и др. 3–4 (14–24)
 Мазина Н. К., Мазин П. В., Хафизьянова Р. Х. Клиническая эффективность Циклоферона в составе комплексной терапии туберкулёза. Систематический обзор и результаты метаанализа 3–4 (14–24)
 Мазина Н. К., Анисимова С. Г. Влияние митохондриальных субстратов и кофакторов на выработку и состав слёзной жидкости при синдроме сухого глаза профессионального генеза 9–10 (44–49)
 Макаренкова И. Д. см. Беседнова Н. Н. и др. 11–12 (54–67)
 Максимов В. А. см. Логинова С. Я. и др. 5–6 (12–17)
 Максимов В. А. см. Логинова С. Я. и др. 7–8 (19–23)
 Максимов В. А. см. Логинова С. Я. и др. 11–12 (31–34)
 Матыцин В. О. см. Ганапольский В. и др. 5–6 (49–53)
 Мельников М. А. см. Черникова Н. К. и др. 1–2 (8–13)
 Мельникова Е. В., Меркулова О. В., Чапленко А. А., Рачинская О. А., Меркулов В. А. Мировой опыт регистрации и применения препаратов для генной терапии в клинической практике 1–2 (58–68)
 Меркулов В. А. см. Мельникова Е. В. и др. 1–2 (58–68)
 Меркулова О. В. см. Мельникова Е. В. и др. 1–2 (58–68)
 Мехта С. К. см. Гулий О. И. и др. 1–2 (3–8)
 Мингаирова А. Г. см. Савченко О. А. и др. 1–2 (20–25)
 Мирошниченко Ю. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Мирская М. А. см. Липатов К. В. и др. 5–6 (39–43)
 Митрошин А. Н. см. Суслов А. В. и др. 1–2 (14–19)
 Михайлов В. В. см. Андрюков Б. Г. и др. 7–8 (44–55)
 Мищенко В. М. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Младов В. В. см. Данилов А. И. и др. 9–10 (39–43)
 Моисеева И. Я. см. Суслов А. В. и др. 1–2 (14–19)
 Молчанов И. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Мохов А. С. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Муравьева Е. В. см. Белов Б. С. и др. 3–4 (92–96)

Натаров С. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Ни О. Г. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Никитина Е. В. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Николаева А. В. см. Сердюкова Д. М. и др. 11–12 (39–47)
 Нимирская С. А. см. Черникова Н. К. и др. 1–2 (8–13)

Орлов Ю. П. Митохондриальная дисфункция как проблема критических состояний. Роль сукцинатов. Миф или реальность завтрашнего дня? 7–8 (63–68)
 Орябинская Л. Б., Прасанна Д. Б., Лазаренко Л. Н. Пробиотические и биотерапевтические свойства танназопозитивного штамма *Lactobacillus plantarum* MTCC 2621 9–10 (14–20)

Павелкина В. Ф. см. Ускова Ю. Г. 1–2 (26–3)
 Павлинова Е. Б. см. Савченко О. А. и др. 1–2 (20–25)
 Павлович Н. В., Цимбалистова М. В. Повышение антибактериальной активности цефалоспоринов в отношении *Francisella tularensis* 7–8 (8–12)
 Пайдиева К. Т. см. Антосюк О. Н. 7–8 (13–18)
 Памяти Г. В. Долговой 9–10 (56)
 Парфенов С. А., Тучин И. А. Обоснование возможности применения антиоксидантных препаратов с целью профилактики внебольничной пневмонии у военнослужащих, проходящих военную службу по призыву 7–8 (34–37)
 Пенжоян Г. А. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Персиянова Е. В. см. Беседнова Н. Н. и др. 3–4 (59–70)

Персиянова Е. В. см. Запорожец Т. С. и др. 5–6 (32–38)
 Песков А. Б. см. Долгова Д. Р. и др. 5–6 (18–21)
 Петров А. А., Лебедев В. Н., Сизикова Т. Е., Плеханова Т. М., Борисевич С. В. Анализ применения антисмысловых олигонуклеотидов для профилактики и лечения опасных и особо опасных вирусных инфекционных заболеваний 7–8 (56–62)
 Петров А. А. см. Сизикова Т. Е. и др. 9–10 (50–55)
 Петряйкина Е. Е. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Плеханова Т. М. см. Петров А. А. и др. 7–8 (56–62)
 Плохотнюк Н. В. см. Притулина Ю. Г. и др. 3–4 (25–30)
 Поливанов В. А. см. Кузьмина А. В. и др. 11–12 (48–53)
 Полушин Ю. С. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Полянская Н. А. см. Савченко О. А. и др. 1–2 (20–25)
 Попов С. В. см. Стуров Н. В. и др. 7–8 (69–74)
 Портной Ю. А. см. Алиева К. Н. и др. 9–10 (8–13)
 Прасанна Д. Б. см. Орябинская Л. Б. и др. 9–10 (14–20)
 Припутневич Т. В. см. Сердюкова Д. М. и др. 11–12 (39–47)
 Притулина Ю. Г., Филь Г. В., Корниченко С. В., Плохотнюк Н. В. Применение гепатопротектора «Ремаксол» в терапии больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ-инфекцией и хроническим гепатитом С 3–4 (25–30)
 Проценко Д. Н. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Пшукова Е. М. см. Балоева Д. А. и др. 11–12 (35–38)
 Пьянков О. В., Боднев С. А., Зайковская А. В., Казаков В., Шмидт Г. Ингибирование репликации вируса денге препаратом Инфлюцид *in vitro* 5–6 (3–8)

Рачина С. А., Захаренков И. А., Яцышина С. Б., Бобылев А. А., Хрулева Ю. В. Антибактериальная терапия тяжёлой внебольничной пневмонии у взрослых — нужны ли новые препараты? 3–4 (38–47)
 Рачина С. А., Белькова Ю. А., Козлов Р. С., Анисеев А. С., Толпыго А. В., Бурасова Е. Г., Ежова Л. Г., Елохина Е. В., Мищенко В. М., Ни О. Г., Пенжоян Г. А., Свентицкая Е. Е., Стреж Ю. А., Шегимова В. Д. Одномоментное многоцентровое исследование использования антимикробных препаратов в российских стационарах: результаты проекта GLOBAL-PPS 2017 5–6 (54–63)
 Рачинская О. А. см. Мельникова Е. В. и др. 1–2 (58–68)
 Решетников О. В. см. Хрянин А. А. 7–8 (75–83)
 Рогова Н. В. см. Кузьмина Т. Н. 9–10 (33–38)
 Романова И. В. см. Кисина В. И. и др. 3–4 (31–37)
 Рыжиков А. Б. см. Скарнович М. А. и др. 11–12 (25–30)

Сабитов А. У. см. Веревищikov В. К. и др. 3–4 (10–13)
 Савченко О. А., Павлинова Е. Б., Мингаирова А. Г., Власенко Н. Ю., Полянская Н. А., Киришина И. А. Оценка эффективности комплексной терапии перинатальных заболеваний у новорождённых с экстремально низкой массой тела 1–2 (20–25)
 Свентицкая Е. Е. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Свиридкина Л. П. см. Журавлева М. В. и др. 5–6 (9–12)
 Седищев И. П. см. Иванов И. С. и др. 11–12 (8–15)
 Семенова Е. Ф. см. Суслов А. В. и др. 1–2 (14–19)
 Сердюкова Д. М., Шабанова Н. Е., Любасовская Л. А., Николаева А. В., Шмаков Р. Г., Скоробогатый А. В., Припутневич Т. В. Современное состояние антибиотикорезистентности оппортунистических патогенов и уровня потребления антибактериальных препаратов в акушерском стационаре федерального значения третьего уровня 11–12 (39–47)
 Серёдкин Е. А. см. Соколова В. И. и др. 9–10 (26–32)
 Семенова О. В. см. Королева Л. С. и др. 7–8 (3–7)
 Сидоренко С. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Сидоренко С. В. см. Цветкова И. А. и др. 5–6 (22–31)
 Сизикова Т. Е. см. Петров А. А. и др. 7–8 (56–62)
 Сизикова Т. Е., Лебедев В. Н., Петров А. А., Борисевич С. В. Оценка эффективности неспецифических средств медицинской защиты в отношении заболевания, вызванного вирусом Эбола 9–10 (50–55)

Сильников В. Н. см. Королева Л. С. и др. 7–8 (3–7)
 Сильченко А. С. см. Смолина Т. П. и др. 9–10 (3–7)
 Синёва О. Н., Иванкова Т. Д., Терехова Л. П. Низкотемпературное хранение актиномицетов — представителей рода *Streptomyces* 3–4 (3–9)
 Скарнович М. А., Скарнович М. О., Шишкина Л. Н., Бормотов Н. И., Рыжиков А. Б., Агафонов А. П. Определение чувствительности штамма вируса гриппа А(Н7N9) к противовирусным препаратам *in vitro* и *in vivo* 11–12 (25–30)
 Скарнович М. О. см. Скарнович М. А. и др. 11–12 (25–30)
 Скопец А. А. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Скоробогатый А. В. см. Сердюкова Д. М. и др. 11–12 (39–47)
 Смолина Т. П., Кузнецова Т. А., Иванушко Л. А., Гажа А. К., Сильченко А. С., Беседнова Н. Н. Фенотипические изменения субпопуляции НК- и НКТ-клеток человека сульфатированными полисахаридами 9–10 (3–7)
 Смолина Т. П. см. Крылова Н. В. и др. 11–12 (16–24)
 Соколова В. И., Сычёв Д. А., Васильева Е. И., Серёдкин Е. А. Менингит: трудности диагностики, клиника и лечение 9–10 (26–32)
 Соловьева Л. М. см. Андреева И. В. и др. 7–8 (31–33)
 Стецюк О. У. см. Андреева И. В. и др. 7–8 (31–33)
 Стреж Ю. А. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Стуров Н. В., Попов С. В., Лесная О. А. Этиотропная терапия острого цистита у беременных 7–8 (69–74)
 Суворова М. П. см. Яковлев С. В. 3–4 (71–80)
 Суслов А. В., Семенова Е. Ф., Митрошин А. Н., Моисеева И. Я., Чаиркин И. Н., Сулова И. С. Диагностическая значимость пристеночной и полостной микрофлоры толстого кишечника при антибиотик-ассоциированном дисбактериозе 1–2 (14–19)
 Сулова И. С. см. Суслов А. В. и др. 1–2 (14–19)
 Сычёв Д. А. см. Соколова В. И. и др. 9–10 (26–32)

Таликова Е. В. см. Коломиец В. М. и др. 5–6 (44–48)
 Таликова Е. В. см. Коломиец В. М. и др. 11–12 (68–71)
 Тарасова Г. М. см. Белов Б. С. и др. 1–2 (50–57)
 Тарасова Г. М. см. Белов Б. С. и др. 5–6 (77–84)
 Тарасова Г. М. см. Белов Б. С. и др. 3–4 (92–96)
 Терехова Л. П. см. Синева О. Н. и др. 3–4 (3–9)
 Терехова Л. П. см. Ефименко Т. А. и др. (5–6) (64–68)
 Толпыго А. В. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Трачук К. Н. см. Иванов И. С. и др. 11–12 (8–15)
 Тучин И. А. см. Парфенов С. А. 7–8 (34–37)
 Тюшева Е. Н. см. Зайцев А. А. и др. 1–2 (44–49)

Ускова Ю. Г., Павелкина В. Ф. Оксидативный стресс и его коррекция при геморрагической лихорадке с почечным синдромом 1–2 (26–33)

Федотова А. Ю. см. Долгова Д. Р. и др. 5–6 (18–21)
 Фельдблюм И. В. см. Брико Н. И. и др. 1–2 (37–43)
 Филь Г. В. см. Притулина Ю. Г. и др. 3–4 (25–30)
 Фирсов А. А. см. Алиева К. Н. и др. 9–10 (8–13)
 Фоминых С. Г., Данилов А. И., Гонношенко В. Н., Кальченко Е. В. Интервальный прогноз величины долей доминирующих раневых патогенов в этиологической структуре раневых инфекций и оценка потенциальной эффективности антимикробных препаратов 7–8 (24–30)
 Фролова В. В., Гурина С. В., Чернов Н. М., Яковлев И. П. 4,4А-Дигидроксантоны как перспективные соединения для создания новых антимикробных соединений 11–12 (3–7)

Хаманова Ю. Б. см. Веревищikov В. К. и др. 3–4 (10–13)
 Хамитов Р. А. см. Логинова С. Я. и др. 5–6 (12–17)
 Хамитов Р. А. см. Логинова С. Я. и др. 7–8 (19–23)

Хамитов Р. А. см. Логинова С. Я. и др. 11–12 (31–34)
 Хафизьянова Р. Х. см. Мазина Н. К. и др. 3–4 (14–24)
 Хмелев А. Л. см. Черникова Н. К. и др. 1–2 (8–13)
 Хрулева Ю. В. см. Рачина С. А. и др. 3–4 (38–47)
 Хрупкин В. И. см. Липатов К. В. и др. 5–6 (39–43)
 Хрянин А. А., Решетников О. В. Микоплазменная инфекция в патологии человека и роль антибактериальных препаратов 7–8 (75–83)
 Хубутия М. Ш. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)

Цветкова И. А., Беланов С. С., Гостев В. В., Калиногорская О. С., Волкова М. О., Мохов А. С., Никитина Е. В., Калисникова Е. Л., Иванова К. А., Володина А. А., Сидоренко С. В. Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг. 5–6 (22–31)
 Цимбалистова М. В. см. Павлович Н. В. 7–8 (8–12)

Чаиркин И. Н. см. Суслов А. В. и др. 1–2 (14–19)
 Чапленко А. А. см. Мельникова Е. В. и др. 1–2 (58–68)
 Черкасов Ю. Е. см. Липатов К. В. и др. 5–6 (39–43)
 Черникова Н. К., Борисевич С. В., Хмелев А. Л., Нимирская С. А., Мельников С. А. Оценка возможности использования Ингавирина для предотвращения и лечения поствакцинальных реакций на ТЭОВак в эксперименте на животных 1–2 (9–13)
 Чернов Н. М. см. Фролова В. В. и др. 11–12 (3–7)

Шабанова Н. Е. см. Сердюкова Д. М. и др. 11–12 (39–47)
 Шаталов Д. О. см. Беляков С. В. и др. 9–10 (21–25)
 Шаталов Д. О. см. Иванов И. С. и др. 11–12 (8–15)
 Шевченко Н. М. см. Запорожец Т. С. и др. 5–6 (32–38)
 Шегимова В. Д. см. Рачина С. А. и др. 5–6 (54–63)
 Шемякина Е. Н. см. Веревищikov В. К. и др. 3–4 (10–13)
 Шишкина Л. Н. см. Скарнович М. А. и др. 11–12 (25–30)
 Шмаков Р. Г. см. Сердюкова Д. М. и др. 11–12 (39–47)
 Шмидт Г. см. Пьянков О. В. и др. 5–6 (3–8)
 Шутикова А. Л. см. Запорожец Т. С. и др. 5–6 (32–38)
 Шустер А. М. см. Логинова С. Я. и др. 7–8 (19–23)

Шеголев А. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Щукина В. Н. см. Логинова С. Я. и др. 5–6 (12–17)
 Щукина В. Н. см. Логинова С. Я. и др. 7–8 (19–23)
 Щукина В. Н. см. Логинова С. Я. и др. 11–12 (31–34)

Этезова Ж. Б. см. Балоева Д. А. и др. 11–12 (35–38)

Юдин С. М. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Юров Д. Е. см. Журавлева М. В. и др. 5–6 (9–12)

Языкова Е. И. см. Иванов И. С. и др. 11–12 (8–15)
 Яковлев И. П. см. Фролова В. В. и др. 11–12 (3–7)
 Яковлев С. В. см. Алехин А. В. и др. 1–2 (34–36)
 Яковлев С. В. см. Кисина В. И. и др. 3–4 (31–37)
 Яковлев С. В. Новая концепция рационального применения антибиотиков в амбулаторной практике 3–4 (48–58)
 Яковлев С. В., Суворова М. П. Цефотаксим/сульбактам: важное пополнение в арсенале ингибиторозащищённых бета-лактамов антибиотиков 3–4 (71–80)
 Яринич Л. А. см. Королева Л. С. и др. 7–8 (3–7)
 Ятманов А. Н. см. Ганопольский В. и др. 5–6 (49–53)
 Яцышина С. Б. см. Рачина С. А. и др. 3–4 (38–47)

**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 No01049/01 от 14.03.2008 - линимент 5%, 5 мл



Для взрослых
и детей с 4 лет



Полисан